

ZUR WEITEREN CHARAKTERISIERUNG
EINER AVIÄREN
DYSGAMMAGLOBULINÄMIE

Dietlinde Tiemeyer

ZUR WEITEREN CHARAKTERISIERUNG
EINER AVIÄREN
DYSGAMMAGLOBULINÄMIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Dietlinde Tiemeyer
Rosenheim 1986

durchgeführt am
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Cleve
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. W. Gutensohn
- Sondervotum: Prof. Dr. vet. med. U. Lösch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 1986

Herrn Prof. Dr. U. Lösch bin ich zu großem Dank verpflichtet. Von ihm stammte die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen. Seine jederzeit gewährte Unterstützung und seine fachliche Beratung ermöglichte die Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager danke ich an dieser Stelle für sein freundliches Entgegenkommen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München danke ich sehr für sein Interesse und seine Ratschläge, sowie für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Ziegler (Gesellschaft für Strahlenforschung, Institut für Biochemie, Abteilung Zellchemie, München) für ihren fachlichen Rat und ihre Hilfe bei der Pteridinanalytik.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts, insbesondere bei Frau Zappe und Frau Mantel für die erwiesene Hilfsbereitschaft und die aufmunternden Worte im Verlaufe dieser Arbeit.

Zuallerletzt möchte ich mich herzlich bei meinem Mann, Herrn Dr. Winfried Tiemeyer, bedanken, der mit seinem Rat, seiner Geduld und seiner Bereitschaft zu Diskussionen erheblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0014

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Literatur	1
1.1. Immunmangelerkrankungen beim Menschen	1
1.2. Immundefizienzen beim Vogel	7
1.2.1. Experimentell erzeugte Immunerkrankungen	7
1.2.1.1. Thymektomie	7
1.2.1.2. Bursektomie	8
1.2.1.2.1. Chirurgische Bursektomie vor und nach dem Schlupf	8
1.2.1.2.2. Hormonelle Bursektomie	10
1.2.1.2.3. Chemische Bursektomie	10
1.2.1.2.4. "Infektiöse" Agammaglobulinämie	11
1.2.1.2.5. Virus-induzierte Unterdrückung der Bursafunktionen	12
1.2.2. Spontane Immunerkrankungen des Vogels	13
1.2.2.1. Autoimmun-Thyreoditis	13
1.2.2.2. Dysgammaglobulinämie	14
1.2.2.2.1. UM-B19 Linie	15
1.2.2.2.2. Charakteristika der dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühner	16
1.2.2.2.3. Modellvorstellung über die UM-B19 Linie	20
1.2.2.2.4. Selektiver IgG-Mangel beim Menschen	21
1.2.2.2.5. UCD 140 Hühnerlinie	21
1.3. Das Immunsystem des Huhnes	23
1.4. Purinstoffwechsel	28
1.5. Pteridine	33
1.6. Xanthinoxidase, ein kataboles Enzym der Purine und Pteridine	36

2. Problemstellung	40
3. Material und Methoden	42
3.1. Tiermaterial	42
3.1.1. UM-B19 Hühner	42
3.1.2. Kontrollhühner	42
3.2. Lymphozytengewinnung	42
3.2.1. Blutentnahme	42
3.2.2. Langsamzentrifugation	43
3.2.3. Ficoll-Gradient	43
3.2.4. Bestimmung der Anzahl lebender Lymphozyten	43
3.3. Kultivierung	44
3.3.1. Material	44
3.3.2. Kultivierung	44
3.3.3. Mediumzusätze	45
3.3.3.1. verschiedene Mediumzusätze	45
3.3.3.2. Gewinnung und Inaktivierung von Serum	46
3.3.3.3. Herstellung von Immunglobulin-freiem Serum	46
3.4. Zelluläre Aktivitäten	46
3.4.1. Mitogene Stimulierung	46
3.4.2. Plastikadherenz	47
3.4.3. Zelltrennung über Nylonwolle	48
3.4.4. Kokultur	48
3.4.5. Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf den ^3H -Tdr-Einbau in PWM-stimulierte Lymphozyten	49
3.5. Purin- und Pteridinstoffwechsel	49
3.5.1. Purinbestimmung in Zellen und 6-Tage Überständen	49
3.5.2. Purinbestimmung im Plasma	51

3.5.3. Purinstoffwechsel	51
3.5.3.1. Einfluß von Hypoxanthin auf die Stimulierung von Lymphozyten	51
3.5.3.2. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Hypoxanthin, Adenin und Glycin in PWM-stimulierte Lymphozyten	52
3.5.3.3. Stoffwechsel von Hypoxanthin in Lymphozyten	52
3.5.4. Pteridinbestimmung	54
3.6. Untersuchungen zur Xanthindehydrogenase	56
3.6.1. Bildung von Harnsäure in zerstörten und lebenden aviären Lymphozyten	56
3.6.2. Harnsäurebildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl	57
3.6.3. Bestimmung der apparenten kinetischen Größen K_m^i, V_{max}^i	57
3.6.4. Harnsäurebildung in aviären Lymphozyten nach Trypsinierung	57
3.6.5. Harnsäurebildung in lebenden aviären Lymphozyten bei pH 7,4	58
3.7. Statistische Analyse	58
4. Ergebnisse	59
4.1. Zellgewinnung und Kultivierung	59
4.1.1. Lymphozytengewinnung	59
4.1.2. Zellkultivierung	60
4.1.2.1. Kultivierung von aviären Kontrolllymphozyten in Petrischalen, Röhrchen oder Kulturflaschen	60
4.1.2.2. Partieller Mediaumtausch an Tag 3	60
4.1.2.3. Verschiedene Zellkonzentrationen an Tag 0	63

4.1.2.4. Wirkung verschiedener Mediumzusätze	63
4.1.2.4.1. Wirkung von fötalem Kälberserum (FCS) auf die Stimulierung mit PWM von KO-Lymphozyten	66
4.1.2.4.2. Wirkung von normalem Hühnerserum (HS) auf die Stimulierung mit PWM von KO-Lymphozyten	70
4.1.2.4.3. Vergleichende Untersuchung zur Wirkung von HS und FCS auf die Stimulierbarkeit von KO-Lymphozyten	70
4.1.2.4.4. Wirkung verschiedener Hühnerseren als Mediumzu- sätze auf die PWM-Stimulation von KO-Lymphozyten	75
4.1.2.4.5. Pufferung des Kulturmediums mit Hepes-Puffer	76
4.1.2.4.6. Wirkung von 2-Mercaptoaethanol (2-ME) auf die PWM-Stimulierung von KO-Lymphozyten	76
4.1.2.4.7. Wirkung von Ovalbumin, Glucose und Thyroxin als Mediumadditive	79
4.1.3. Zusammenfassung der Zellgewinnung und Kultivierung	81
4.2. Zelluläre Aktivitäten	83
4.2.1. Mitogene Stimulierung	83
4.2.1.1. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit PWM	83
4.2.1.2. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit ConA	93
4.2.1.3. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit PHA und LPS	102
4.2.2. Zelltrennung	105
4.2.3. Kokultur	108
4.2.4. Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf den ³ H-Tdr-Einbau von PWM-stimulierten Lymphozyten	115
4.3. Purin- und Pteridinstoffwechsel	123
4.3.1. Analytische Bedingungen	123
4.3.2. Purin- und Pyrimidingehalt in aviären Blutlymphozyten und 6-Tage Überständen	126

4.3.3. Puringehalt im Hühnerplasma	132
4.3.4. Einfluß von Hypoxanthin auf die Stimulierung von Lymphozyten mit PWM	132
4.3.5. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Hypoxanthin, Adenin und Glycin in PWM-stimulierte Lymphozyten	134
4.3.6. Stoffwechsel von Hypoxanthin in Hühnerlymphozyten	136
4.3.7. Pteridingehalt in aviären Lymphozyten und 6-Tage Überständen	148
4.4. Untersuchungen zur Xanthinoxidase/dehydrogenase	154
4.4.1. Bildung von Harnsäure in zerstörten und lebenden aviären Lymphozyten	154
4.4.2. Harnsäurebildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl	155
4.4.3. Bestimmung der apparenten kinetischen Größen K_m^i und V_{max}^i	160
4.4.4. Harnsäurebildung in aviären Lymphozyten nach Trypsinierung	170
4.4.5. Harnsäurebildung in aviären Lymphozyten bei pH 7.4	172
5. Diskussion	175
5.1. Kulturmethoden	175
5.2. Zelluläre Aktivitäten	179
5.3. Purin- und Pteridinstoffwechsel	186
5.4. Xanthinoxidase/dehydrogenase	195
5.5. Modellvorstellung über die Dysgammaglobulinämie	202
6. Zusammenfassung	208
7. Literaturverzeichnis	211

A B K Ü R Z U N G E N

A-HS	inaktives Serum von agammaglobulinämischen Hühnern
ADA	Adenosin-desaminase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
aut-Med	autologes Medium aus der 6-Tage Kultur
B _G	Lymphozyten die IgG produzieren
B _M	Lymphozyten die IgM produzieren
ConA	Concanavalin A
CVID	variable Immundefizienz (common variable immunodeficiency)
D-Form	Dehydrogenase-Form
D-HS	inaktives Serum von dysgammaglobulinämischen Hühnern
DTH	Allergie vom verzögerten Typ
DYS	dysgammaglobulinämisches Huhn
DYS-Med	6-Tage Kulturmedium von Lymphozyten eines dysgammaglobulinämischen Huhnes
F-Med	frisches Kulturmedium
FCA	Freunds komplettes Adjuvans
FCS	fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
Gua	Guanosin
H-Tiere	high responders
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Hs	Harnsäure

HS	inaktives Hühnerserum
HSA	Humanserumalbumin
Hyp	Hypoxanthin
Ig	Immunglobulin
Il-2	Interleukin-2
KO	Kontrollhuhn
KO-Med	6-Tage Kulturmedium von Lymphozyten eines Kontrollhuhnes
L-Tiere	low responders
LPS	Lipopolysaccharid
M-Tiere	medium responders
2-ME	2-Mercaptoaethanol
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NO	normogammaglobulinämisches Huhn
5' -NT	5' -Nucleotidase
O-Form	Oxidase Form
PHA	Phytohämagglutinin
PNP	Purin-Nucleosid-Phosphorylase
PRPP	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
PWM	Pokeweed Mitogen
SCID	schwere, kombinierte Immundefizienz (severe combined immunodeficiency)
³ H-Tdr	³ H-Thymidin
Urd	Uridin
Xan	Xanthin
XDH	Xanthindehydrogenase
XOD	Xanthinoxidase

1. Einleitung und Literatur

Bei Mensch und Tier ist eine Vielzahl von Immundefekten beschrieben, bei denen unter anderem eine Veränderung des Serumimmunglobulinmusters auftritt. Neben den Experimentalmodellen, wie z.B. Thym- oder Splenektomie, stehen viele Versuchs- und Nutztiermodelle zur Verfügung, so z.B. die thymusaplastische Nacktmaus (Pantelouris 1968), die kombinierte Immundefizienz der Araberfohlen (McGuire and Popple 1973; Perryman and Torbeck 1980), Gammopathien bei Hund und Katze (Hurvitz 1974) oder die Dysgammaglobulinämien in Hühnerlinien (Brüggemann et al. 1967; Lösch 1972; Benedict et al. 1977). Diese Modelle trugen zunächst zur Aufklärung der grundlegenden morphologisch-funktionellen Zusammenhänge im Immunsystem bei.

Die Verfügbarkeit einer immundefizienten Hühnerlinie erlaubte, neben verschiedenen zellulären Reaktionen die Beteiligung von Stoffwechselprozessen an diesem phänotypisch charakterisierten Immundefekt-Modell zu untersuchen.

1.1. Immunmangelerkrankungen beim Menschen

Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten, dem humoralen mit den Immunglobulinen, die von den B(bursaabhängigen bzw. bursaäquivalenten)-Lymphozyten sezerniert werden, und dem zellulären System, das sich aus Lymphozyten zusammensetzt, die sich von T(thymusabhängigen)-Zellen ableiten, Lymphokine sezernieren und Targetzellen direkt zerstören können.

Good und Mitarbeiter (Peterson et al.1965) haben die Rolle der verschiedenen Organe bei der Entwicklung des reifen Immunsystems untersucht und sie mit verschiedenen, menschlichen Immunmangelsyndromen korreliert. Für die Entwicklung zellvermittelter Immunreaktionen scheint der Thymus unentbehrlich zu sein (Miller and Osoba 1967), während für die humorale Immunantwort Teile des embryonalen Gastrointestinaltraktes (Bursa fabricii, Leber, Peyersche Platten und Appendix) von Bedeutung sind (Cooper and Lawton 1974). Bestimmte (T-abhängige) Antigene aber können eine Antikörperbildung nur dann induzieren, wenn eine Kooperation zwischen T- und B-Zellen und teilweise mit Makrophagen besteht (Feldmann and Nossal 1972).

Immunmangelzustände können ihre Ursache sowohl im T- als auch B-abhängigen System oder in der Kombination beider Systeme haben. Es ist dabei zu bedenken, daß Defekte, die die Entwicklung z.B. von T-Lymphozyten betreffen, primär zu einer gestörten zellvermittelten Immunreaktion führen, die humorale Reaktion ist dabei nur mittelbar betroffen.

Die meisten der definierten Immundefekte bei Mensch und Tier beruhen auf einem genetischen Defekt. Es gibt eine Vielzahl solcher Defekte, von großen Chromosomenbrüchen, Deletion oder Punktmutation der DNA bis zu Irrtümern bei der Transskription oder Translation. Genetische Defekte beeinflussen Membranfunktionen (Oliver et al.1980), Antigenerkennung, Zell-Zell-Interaktionen und die Transmission der Signale in die Zelle (Siegal et al.1978; Filipovich and Kersey 1983). Bei der normalen B-Zellfunktion der Säuger scheint das X-Chromosom eine wichtige Rolle zu spielen, 5 von 17 untersuchten Immundefizienzen beim Menschen

sind X-chromosomal (WHO Report 1979) und die Deletion des kurzen Armes des X-Chromosomes kann mit Hypogammaglobulinämie und T-Zell-Dysfunktion assoziiert sein (Nurmi et al.1981). Daneben gibt es noch eine Vielzahl autosomaler Immunkrankheiten.

Am besten untersucht ist die infantile X-chromosomale Agammaglobulinämie (Bruton Typ). Dieser Typ der rezessiven X-chromosomalen Hypogammaglobulinämie ist durch das fast völlige Fehlen der humoralen Immunreaktion gekennzeichnet, wobei IgG meist in Spuren vorhanden ist, und die IgM- und IgA-Konzentrationen sehr niedrig liegen. Die Patienten können gegen eine Reihe bakterieller Antigene trotz vorausgegangener Immunisierung oder Infektion keine Antikörper bilden (Good 1954), ebenso ist die Fähigkeit zur Komplementbindung herabgesetzt (Hong and Good 1967). Dagegen scheint die zelluläre Immunität normal zu sein. Hauttransplantate werden abgestoßen und die Hautreaktion vom verzögerten Typ zeigt keine Störungen. Die Lymphozyten im peripheren Blut sind nach Zahl und Aussehen unauffällig. T-Zellen zeigen normale Anzahl und Funktion. T-Zellsubtypen können normal oder abnormal (erhöhte Suppressor-Aktivität) vorkommen (Reinherz et al.1981). Plasmazellen fehlen völlig, sie sind weder in Lymphknoten, noch im Knochenmark und Intestinaltrakt nachzuweisen, obwohl bei vielen Patienten pre-B-Zellen im Knochenmark vorhanden sind (Pearl et al.1978; Fu et al.1980). Der primäre Gendefekt ist bislang nicht geklärt. Als Ursache wurde sowohl die Mutation eines auf dem X-Chromosom lokalisierten Regulatorgens für die Ig-Synthese (Parker and Bearn 1963, Fudenberg et al.1963) als auch ein Entwicklungsdefekt des peripheren lymphoiden Gewebes mit gestörter Plasmazell-

differenzierung und T-Zellsuppression der pre-B-Zellen (Siegal et al.1976) vermutet.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab.1) ist die Klassifizierung der primären Immundefizienzen widergegeben. Sellgman et al. lieferten 1968 mit ihrer vorgeschlagenen Klassifizierung die Grundlage für diese Einteilung. Von einigen Ergänzungen (Cleve und Lehmann 1976) abgesehen entspricht sie den Empfehlungen der WHO-Kommission (Fudenberg et al.1970)

Viele Immundefizienzen sind mit Hypogammaglobulinämien gekoppelt. Die meisten Patienten mit schwerer, kombinierter Immundefizienz (SCID), X-chromosomaler Agammaglobulinämie oder variablen Immundefizienzen zeigen eine Verminderung aller Immunglobulinklassen. Diese Patienten weisen die verschiedensten Defekte in der zellulären Differenzierung, zellulären Interaktion und zellulären Biosynthese, die für die Immunantwort notwendig sind, auf. Die Ursache des Defektes kann in der Entwicklung und/oder Differenzierung der Stammzelle zur Plasmazelle, in einem primären Stoffwechseldefekt (z.B. Purinstoffwechsel) oder einer gestörten Zellinteraktion liegen. Somit induzieren unterschiedlichste Primärdefekte häufig phänotypisch gleichartige Erscheinungsbilder.

Das Erscheinungsbild der variablen Immundefizienz (CVID) umfaßt genetisch völlig verschiedene Defekte (X-chromosomal, sporadisch und autosomal rezessive Formen), die sich in den verschiedenen betroffenen Zellpopulationen widerspiegeln. Weder die klinischen noch die immunologischen oder genetischen Befunde erlauben bislang eine eindeutige Abgrenzung der verschiedenen

Tab.1 : Übersicht über die häufigsten Immunmangelerkrankungen
unterteilt nach dem betroffenen Zellsystem

- I. Defekte mit primärer B-Zellstörung (humorale Defizienz)
 - Infantile X-chromosomale Agammaglobulinämie (Bruton-Typ)
 - Transitorische Hypogammaglobulinämie des Kleinkindes
 - Hypergammaglobulinämien:
 - z.B. X-chromosomale Immundefizienz mit Hyper-IgM
 - Hypogammaglobulinämie:
 - alle Immunglobuline betroffen
 - selektiver Immunglobulinmangel (z.B. IgA oder IgE)
- II. Defekte mit primärer T-Zellstörung (zellvermittelte Defizienz)
 - Di-George Syndrom
 - Nezelof-Syndrom
- III. Kombinierte Immundefizienzen
 - Schwere kombinierte Immundefizienz (severe combined immunodeficiency; SCID)
 - Variable Immundefizienzen (common variable immunodeficiency; CVID)
 - Wiskott-Aldrich Syndrom
 - Ataxia teleangiectasia
 - Thymom mit Hypogammaglobulinämie
 - Kombinierter Immundefekt mit Adenosindeaminase-Mangel

Formen.

Die Mehrzahl der Patienten mit CVID besitzen B- und T-Zellen, doch wurden sowohl Unterschiede bezüglich der B-Zell-Anzahl, B-Zell-Reifung (Siegal et al.1978), Antwort auf Mitogene (Pahwa et al.1982) und Ig-Sekretion (Cooper et al.1971) wie auch gestörte T-Zellregulation (Webster and Asheron 1974) beobachtet. Auch ein primärer Mangel an B-Zellen (Hayward and Greaves 1975) oder die Unfähigkeit, synthetisiertes Immunglobulin freizusetzen, konnte gezeigt werden (Choi et al.1972; Broom et al.1976). Oft zeigt die CVID A- bzw. Hypogammaglobulinämie, wobei sowohl die verminderte Synthese aller Immunglobulinklassen (Fudenberg et al.1962) als auch das Fehlen einer selektiven Klasse beobachtet wurde (Yount et al.1970).

Als Ursache für die verminderte Immunglobulinproduktion wurden Defekte innerhalb der verschiedenen B-Zell-Reifungsstadien bis zur Endzelle, hohe T-Suppressoraktivität, defekte Helfer-Zellaktivitäten, Anwesenheit von Serum- oder Gewebsinhibitoren oder Stoffwechselstörungen angenommen (Cooper et al.1971; Geha et al.1974; Siegal et al.1978).

Über den Mechanismus der selektiven Immunglobulindefizienz ist nur wenig bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Defekt der B-Zellen, bei denen das Isotypswitching nicht stattfindet, oder um klassenspezifische Suppression mit Hilfe von T-Zellen (Waldmann et al.1976). Auch die Unfähigkeit bestimmte IgG-Subtypen auszubilden wurde beobachtet (Van Loghem 1980). Die häufigste Immunglobulindefizienz ist die IgA-Defizienz, die gepaart mit Abnormalitäten des Chromosoms 18 erscheint (Filipovich and Kersey 1983).

1.2. Immundefizienzen beim Vogel

Neben den spontanen Immunerkrankungen (siehe 1.2.2.) bietet der Vogel auf Grund der morphologisch getrennt erfaß- und exstirpierbaren Immundifferenzierungsorgane, Bursa fabricii und Thymus, die Möglichkeit des Experimentalmodells.

1.2.1. Experimentell erzeugte Immunerkrankungen

1.2.1.1. Thymektomie

Die chirurgische Thymektomie des Vogels ist schwieriger als beim Säuger, weil der aviäre Thymus aus 7 Läppchen besteht, die an der rechten und linken Halsseite, entlang der Vena jugularis, angeordnet sind und deren letztes von der Schilddrüse überdeckt wird. Sie kann aus diesem Grund frühestens nach dem Schlupf durchgeführt werden. Da der Thymus schon vor dem Schlupf T-Lymphozyten in die peripheren lymphatischen Organe entläßt (Hemmingsson 1972), ist der Erfolg des Eingriffs nicht vollständig. In Kombination mit Bestrahlung oder Behandlung mit Anti-Lymphozytenserum vermindert die Thymektomie die Antikörperproduktion gegen bestimmte Antigene, während die Immunglobulinkonzentration nicht verändert wird (Cooper et al. 1966; Ivanyi and Salerno 1971). Daneben zeigen so behandelte Hühner eine verminderte Anzahl zirkulierender Lymphozyten, das Fehlen der sogenannten "kleinen Lymphozyten" in ihren peripheren lymphoiden Organen, z.B. in der Milz, eine mangelnde Fähigkeit zur verzögerten allergischen Reaktion und zur graft versus host Reaktion, sowie eine verzögerte Transplantatabstoßung (Cooper et al. 1966). Neonatale chirurgische Thymektomie mit

oder ohne Bestrahlung vermindert oder unterdrückt die Antwort der peripheren Blutlymphozyten auf Phytohämagglutinin (PHA) *in vitro*, abhängig von der Vollständigkeit der Thymektomie (Greaves et al.1968). Somit induziert die komplette Thymektomie an frisch geschlüpften Küken die selben Entwicklungs- und immunologischen Defekte wie die neonatale Thymektomie von Mäusen (Good et al.1962; Miller 1965).

1.2.1.2. Bursektomie

Auf Grund der topographischen Situation der Bursa fabricii als Organ der B-Zelldifferenzierung, kann mit relativ einfachen Manipulationen in die B-Zellentwicklung eingegriffen werden, wie dies beim Säuger nicht möglich ist.

Nach Einwanderung der B-Stammzellen (siehe 1.3.) in die Bursa fabricii vollziehen sich folgende Prozesse:

- a) Die sequentielle Entwicklung der Ig-Synthese (Isotyp-Expression): Eine limitierte Anzahl von Zellen schaltet von der IgM-Synthese zur Oberflächenexpression der anderen Ig-Klassen um.
- b) Die Prägung der Bursazellen zur Antikörperspezifität (Idiotyp-Diversität): Ebenso wie beim Säuger (Silverstein 1964) vollzieht sich auch beim Vogel eine entwicklungsabhängige Reifung der Antikörper-Spezifitäten. Dieser Prozess ist im aviären System bursaabhängig (Toivanen et al.1984).

Deshalb ist der Zeitpunkt der Bursektomie sowohl für die Ausbildung der Immunglobulinisotypen als auch der Antikörperidiotypen von großer Bedeutung.

1.2.1.2.1. Chirurgische Bursektomie vor und nach dem Schlupf

Die Exstirpation der Bursa fabricii kann frühestens in der 52. Stunde der Embryonalentwicklung (Jankovic et al.1975) und

spätestens (abhängig von der Zuchtlinie) in der 14.-20. Lebenswoche, d.h. eben noch vor der Involution des Organes (Hoffmann-Fezer und Lade 1972) durchgeführt werden.

Die spätmöglichste Bursektomie führt erwartungsgemäß zu keinen meßbaren Befunden. Aber auch die frühest mögliche Bursektomie induziert nicht den tiefgreifendsten Effekt, d.h. den Zustand einer Agammaglobulinämie, da sich die im Embryo befindlichen B-Stammzellen auch extrabursal ansiedeln und zu B_M-Zellen differenzieren können (Bryant et al.1973). Somit wird durch die frühembryonale Bursektomie eine Dysgammaglobulinämie induziert, die durch hohe IgM-Serumspiegel und das völlige Fehlen von IgG und IgA gekennzeichnet ist. Exstirpiert man aber die Bursa nach Beendigung der Einwanderung der B-Stammzellen (circa 14. Embryonaltag) und vor Beginn der Auswanderung der ersten "geprägten" B-Zellen in die Peripherie (circa 18. Embryonaltag), dann entfernt man mit der Bursa alle Vorläufer-B-Zellen und induziert so eine Agammaglobulinämie.

Durch den schwer zu berechnenden, richtigen Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs, wurden in der Literatur nach Bursektomie die verschiedensten Immunmangelsituationen erhalten (Mueller et al.1962; Cooper et al.1966; Jankovic and Isakovic 1966).

Aber auch die Ausbildung der Antikörperdiversität ist vom Zeitpunkt der Bursektomie abhängig. Während neonatal bursektomierte Küken Antikörper gegen Schaferythrozyten, Viren und E.coli synthetisieren können, ist ihre Antwort auf Ovalbumin, B.abortus oder Staphylococcus aureus stark vermindert (Hirota and Bito 1974). Kombiniert man die Bursektomie mit einer subletalen Ganzkörperbestrahlung, so findet man in den Tieren weder Immunglobuline (Agammaglobulinämie) noch eine Antikörperantwort, ebenso fehlen

Keimzentren und Plasmazellen (Cooper et al.1966).

Neben der chirurgischen Bursektomie gibt es noch eine Reihe von Eingriffsmöglichkeiten, die die Bursafunktion hemmen oder eliminieren können.

1.2.1.2.2. Hormonelle Bursektomie

Injektionen von Steroiden (z.B. Testosteron) in Hühnerembryos vor Einsetzen der Lymphozytopoese unterdrücken die epitheliale Entwicklung der Bursa völlig (Meyer et al.1959). Wahrscheinlich wirkt Testosteron auf die Epithelzellen der Bursa über spezifische Hormonrezeptoren (Sullivan and Wira 1979). Wird das Hormon zwischen dem 3.-7. Tag der Brutzeit gegeben, so zeigen die Tiere hohe IgM- und sehr geringe IgG-Serumkonzentrationen (Dysgammaglobulinämie), ohne daß histologisch Bursareste zu finden sind (Lerner et al.1971). Das erhöhte IgM ist möglicherweise die Folge einer fehlenden Rückkopplung durch IgG (SubbaRao et al.1978). Behandelt man die Embryos zwischen dem 11.-13. Tag, so entwickelt sich die Bursa, die Lymphocytopoese jedoch wird unterdrückt (Warner and Burnet 1961). Diese Tiere bilden keine Antikörper und zeigen in den ersten 2 Wochen nach Schlupf eine hohe Sterblichkeitsrate (Warner et al.1962). Dies zeigt, daß die funktionelle Differenzierung der lymphoiden Stammzellen den Kontakt mit dem Bursaepithel benötigt (Toivanen and Toivanen 1973a).

1.2.1.2.3. Chemische Bursektomie

Dieses Modell wurde erstmals von Lerman und Weidanz 1970 beschrieben. Die Injektion von Cyclophosphamid in frisch ge-

schlüpfte Küken führt zu einer schweren, manchmal permanenten Zerstörung der B-Zellfunktionen (Eskola and Toivanen 1974). Die Tiere zeigen Defizienz der Serumimmunglobuline und verminderte Antikörpersynthese. Da Cyclophosphamid nur die lymphoiden Follikel zerstört ohne das Bursaepithel anzugreifen, können chemisch bursektomierte Tiere mit Hilfe von transplantierten lymphoiden Zellen rekonstituiert werden (Toivanen et al.1972).

Daneben wurde noch die kombinierte Behandlung mit Testosteronpropionat während der Embryonalzeit und Cyclophosphamidgabe nach Schlupf beschrieben (Weidanz et al.1976), die einen totalen Verlust der B-Zellfunktionen und Agammaglobulinämie zur Folge hat.

Die Behandlung von Hühnerembryos mit Antiserum gegen μ -Ketten führt zur Hemmung der lymphoiden Entwicklung und somit oft zur Ausbildung einer transitorischen Hypogammaglobulinämie (Kincade et al.1970). In Kombination mit Bursektomie beim Schlupf entstehen agammaglobulinämische Tiere (Grossi et al. 1977).

1.2.1.2.4. "Infektiöse" Agammaglobulinämie

Die durch Bursektomie induzierte Agammaglobulinämie ist charakterisiert durch völliges Fehlen von IgM, IgG und IgA, Fehlen von B-Lymphozyten in allen lymphoiden Organen und im Blut, sowie Fehlen von Keimzentren. Die T-Zellimmunfunktionen aber bleiben erhalten. Erwachsene gesunde Hühner, die Knochenmarkszellen von agammaglobulinämischen Spendern erhalten, verlieren ihre Fähigkeit zur primären und sekundären Antikörperantwort völlig ("infektiöse" Agammaglobulinämie; Blaese et al.1974). Ursache für die Suppression der Immunglobulinproduktion sind

transplantierte T-Suppressorzellen (Grebenaу et al.1976). Blaese et al.1977 konnten außerdem zeigen, daß Zellen von Tieren, die nach chirurgischer Bursektomie Dysgammaglobulinämie zeigen, in Kontrollhühnern einen isotypspezifischen Ig-Mangel induzieren.

1.2.1.2.5. Virus-induzierte Unterdrückung der Bursafunktion

Die lymphoide Leukose ist ein RNA-Virus induziertes Neoplasmon des B-Systems der Hühner. Die Verhinderung der Leukose durch Bursektomie und die Wiederherstellung der Anfälligkeit auf das Virus durch transferierte Bursazellen läßt vermuten, daß die Bursazellen die Zielzellen der viralen Infektion sind (Peterson et al.1964). Der Tumor erscheint in den bursalen Follikeln und metastasiert in die anderen visceralen Organe. Cooper et al. zeigten 1974, daß die Tumorzellen sowohl Zell-Oberflächen-IgM synthetisieren als auch IgM sezernieren, was zu erhöhtem Serum IgM führt. Die infizierten Tiere haben auch erhöhtes IgA und Antikörpertiter gegen heterologe Erythrozyten. Das Auftreten des Tumors in den Bursafollikeln und die heterogene Natur des Serum IgM wurden in Einklang mit einer polyclonalen Beteiligung der B-Zellen diskutiert.

Die akute virus-induzierte infektiöse Bursaerkrankung (Gumboro-Disease) junger Hühner ist charakterisiert durch eine akute Nekrose der lymphoiden Zellen in den bursalen Follikeln, gefolgt von einer Hyperplasie der retikulären Zellen (Cheville 1967) und Immunsuppression (Hirai et al.1974). Zwei morphologisch unterschiedliche Viren erzeugen die Krankheit (Almeida and Morris 1973). Das Auftreten der Immundefizienz hängt vom Zeit-

punkt der Infektion ab. Virale neonatale Bursektomie führt zu schwereren B-Zell-Defizienzen als die chirurgische Bursektomie. Werden die Tiere aber erst einige Tage nach dem Schlupf infiziert, so zeigen sie schwere Bursahypoplasie ohne Immundefizienz. Bei 50% der neonatal infizierten Tiere findet man nach 3-12 Wochen kein IgM mehr (Ivanyi and Morris 1976). Wahrscheinlich ist dies die Folge der relativ kurzen Lebensdauer der IgM-produzierenden B-Zellen und einer Unfähigkeit, B-Zellen aus der aplastischen Bursa nachzuliefern. Daneben ist die Antikörperantwort gegen Bursa Disease Virus, Schaferythrozyten und Humanserumalbumin unterdrückt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die bursalen aber nicht die peripheren B-Zellen die Zielpopulation der Viren sind (Ivanyi and Morris 1976).

1.2.2. Spontane Immunerkrankungen des Vogels

1.2.2.1. Autoimmun-Thyreoiditis

Die spontane Entwicklung der Hypothyreoiditis der Obese-Hühnerlinie ist begleitet von der Autoantikörperbildung gegen Thyreoglobulin. Im Gegensatz zu experimentell induzierten Autoimmun-Modellen, bei denen T-Zellen die Effektoren zu sein scheinen, ist die genetisch kontrollierte Thyreoiditis der Obese-Hühner B-Zell-vermittelt und klinisch, histopathologisch und serologisch dem Krankheitsbild der menschlichen Hashimoto-Thyreoiditis ähnlich (Wick et al.1982). Zwischen dem anti-Thyreoglobulinantikörpergehalt und der lymphoiden Infiltration der Schilddrüse besteht eine enge Beziehung, da die Thyreoiditis in bursektomierten Hühnern stark reduziert auftritt (Wick et al.1970). Die Schild-

drüse der Obese-Hühner enthält neben Thyreoglobulin-bindenden Zellen (Kofler and Wick 1978) auch Antikörper-bildende Zellen, die spezifisch gegen verschiedene exogene Antigene gerichtet sind (Schauenstein and Wick 1974). Die Dysfunktion der B-Zellen drückt sich im erhöhten Serum IgM und verminderten IgA und in der Anwesenheit von Auto-Antikörpern gegen Leber- oder Nierenzellen aus (Luster et al.1977). B-Zellen und ihre Produkte spielen zu Beginn der Krankheit eine entscheidende Rolle, cytotoxische T-Zellen scheinen hierbei von geringer Bedeutung zu sein. Der zu Grunde liegende Defekt scheint in der im Thymus stattfindenden Reifung der Suppressorzellen und dem Ausbleiben ihrer Wanderung in die Peripherie zu liegen. Die Entwicklungsstörung wird multigenetisch, möglicherweise von 3 Genloci kontrolliert (Wick et al.1982).

1.2.2.2. Dysgammaglobulinämie

Als Modell einer CVID kann die erbliche Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Hühner dienen. Nach dem Serumimmunglobulinmuster unterscheidet man zwischen

- a) permanent dysgammaglobulinämischen Hühnern (DYS) mit stark erniedrigten, zum Teil nicht nachweisbaren IgG-Konzentrationen bei erhöhtem IgM und IgA
- b) normogammaglobulinämischen Hühnern (NO), mit der Norm entsprechenden Konzentrationen von IgG und IgM und leicht erhöhten IgA-Konzentrationen.

Bisherige Beobachtungen zeigten, daß die dysgammaglobulinämischen Tiere grundsätzlich zur Synthese von Antikörpern und Immun-

globulinen der IgG-Klasse befähigt sind:

- a) bei einigen, der später dysgammaglobulinämischen Tiere (late-onset Form) tritt in den ersten Lebenswochen eine vorübergehende IgG-Synthese auf (Lösch et al.1981)
- b) bei einigen Tieren normalisieren sich die Serum IgG-Werte mit Eintritt der Geschlechtsreife (transitorische Form; Lösch et al.1981)
- c) Nachkommen von DYS-Tieren, die unter keimfreien Bedingungen aufgezogen werden, zeigen nach Konventionalisierung normale Serumimmunglobulinwerte (Kühlmann-Rabens et al.1986)
- d) bei zusätzlicher Behandlung immunisierter Tiere mit Lipopolysaccharid (LPS) und Levamisol treten vorübergehende Anti-Human Serumalbumin(HSA)-titer vom Isotyp IgG auf (Kühlmann-Rabens et al.1986)

1.2.2.2.1. UM-B19 Linie

Diese spontan auftretende Immundefizienz wurde im Jahre 1965 erstmals beobachtet (Brüggemann et al.1967). Es handelte sich dabei um einen Hahn der Heisdorf-Nelson-Lohmann Legelinie. Zum Aufbau einer Population wurde dieser Hahn mit sieben normalen Leghornhennen gekreuzt. Von insgesamt 101 Nachkommen zeigten 5 das Bild der Dysgammaglobulinämie, 4 allerdings nur bis zum Eintritt der Geschlechtsreife. Interessant war, daß man nur mit einer der 7 normalen, dem Stammhahn angepaarten Legehennen, DYS-Nachkommen erhielt. Der Umstand, daß zeitweilig die Anzahl der Nachkommen außerordentlich gering war, zwang dazu, die jeweils gleichzeitig verfügbaren zeugungsfähigen Hähne

und legenden Hennen ohne Rücksicht auf den Verwandtschaftsgrad einzupaaren. Es zeigte sich, daß die Dysgammaglobulinämie mit dem Erbgut weitergegeben wird, daß sie nicht geschlechtsgebunden ist, und daß die Anzahl der Merkmalsträger im Verlauf der Zucht zunimmt (Lösch 1972). Im Jahre 1977 gelang es eine bezüglich des Haupthistokompatibilitätslocus homozygote Linie der Blutgruppe B19 (B19= international gültige Bezeichnung der nach der Prager Nomenklatur B12 genannten Blutgruppe; Longenecker pers.Mitt.1981; Genotyp B19B19) herauszuzüchten (Fiedler et al.1980). Die Histokompatibilität innerhalb der UM-B19 Linie wurde durch Hauttransplantationsversuche bestätigt (Schröck 1978). Es zeigte sich, daß die Dysgammaglobulinämie nicht an einen bestimmten B-Locus gebunden ist. Der genaue Erbgang dieses Defektes ist bis heute undurchsichtig geblieben.

1.2.2.2. Charakteristika der dysgammaglobulinämischen UM-B19 Linie

a) Immunglobuline

Die Dysgammaglobulinämie äußert sich in einer extremen Erniedrigung des IgG-Spiegels bei gleichzeitig erhöhtem Serum IgM und IgA. Die IgM-Konzentrationen steigen ab der 1. Lebenswoche steil über den Verlauf des Normalspiegels hinaus. Statistisch gesicherte Differenzen liegen ab dem 20.Lebenstag vor. Die IgG-Spiegel differieren signifikant ab dem Schlupftag (wenn die Küken von DYS-Müttern stammen; Brüggemann et al.1969). Bei Verlaufsuntersuchungen bis zur 50.Lebenswoche zeigten einige DYS-Tiere, unabhängig vom mütterlichen IgG-Spiegel, einen vorübergehenden IgG-Peak während der 3.-6. Lebenswoche. Die erhöh-

ten IgM- und IgA-Konzentrationen wurden schon beim Schlupf vorgefunden. Im Falle der transitorischen Dysgammaglobulinämie wurden auch nach Normalisierung der IgG-Konzentration (3.-8. Lebensmonat) weiterhin erhöhte IgM- und IgA-Spiegel nachgewiesen (Lösch et al.1981).

HSA- und Brucella abortus Applikation führte zu einer Beeinflussung der Serum Ig-Konzentrationen, die sich bei DYS-Tieren in einer Steigerung der IgM- und IgA-Spiegel bzw. bei Kontrollen des IgG-Spiegels manifestierte (Lösch et al.1982).

Untersuchungen zur Umsatzrate des IgG im Serum ergaben einen hochgradigen Synthesedefekt (Herlyn et al.1977).

Sedimentationsanalytische Untersuchungen von Seren ergaben bei gesunden Hühnern vier Komponenten, die mit den Sedimentationskonstanten 4S, 7S, 17S und 20S (S=Svedberg Einheit) sedimentieren. Seren erblich dysgammaglobulinämischer Hühner zeigten eine hochgradige Vermehrung der 17S und eine starke Verminderung der 7S-Komponente (Oberdorfer und Lösch 1970). Weitere Untersuchungen mit Hilfe der SDS-Porengradienten-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schranner und Lösch 1986) und der Rocket-Immunoelektrophorese (Dorn 1984) ergaben bei DYS-Tieren nicht nur 2-4fach höhere IgM-Gesamtkonzentrationen sondern in der reduzierten 7S-Fraktion einen erhöhten Anteil an monomerem IgM. Außerdem wiesen die DYS-Hühner trotz erhöhten IgA-Serumkonzentrationen einen deutlich geringeren Anteil an monomerem IgA auf.

Uebel (1984) beschrieb außerdem, daß sich frühe IgM-Antikörper von DYS-Hühnern sowohl serologisch als auch strukturell (im.

ELISA) mehr resistent gegenüber 2-Mercaptoäthanol erweisen, als entsprechende Antikörper von NO- bzw. Kontroll-Hühnern.

Um die Fähigkeit zur Antikörperbildung zu untersuchen, wurde mit verschiedenen Antigenen immunisiert. Es zeigte sich, daß innerhalb der DYS-Population die Immunantwort von der Art des verwendeten Antigens abhängt, und daß die Tiere nicht einheitlich reagieren. Eine nahezu normale Immunantwort wurde genau so festgestellt wie eine vollständig negative Reaktion, wobei die negativen und hochgradig verminderten Reaktionsweisen überwogen. Immunisierung mit Hühnererythrozyten (Brüggemann et al.1971), oder dem T-abhängigen HSA (Lösch et al.1972; Lösch et al.1982) veranlaßte DYS-Hühner zur Bildung von Antikörpern der IgM-Klasse, während Kontrollen hierauf mit einer hohen IgG-Antwort reagieren. Demgegenüber zeigte die Immunisierung mit dem T-unabhängigen Antigen B.abortus ebenso wie die kombinierte Verabreichung von HSA und Freund's komplettem Adjuvans (FCA) neben einer vorherrschenden IgM-Antikörperantwort auch bei den DYS-Tieren ME-resistente Antikörper der IgA-Klasse (Lösch et al.1982). LPS bzw. LPS mit HSA-Behandlung führte in nahezu allen Fällen zur vorübergehenden Bildung von IgG-Antikörpern. Levamisol, ein Immunmodulator, der bei gestörter T-Helfer-T-Suppressor-Verhältnissen regulierend wirkt, konnte einen Teil der Tiere zur vorübergehenden IgG-Synthese befähigen (Kühlmann-Rabens et al.1986).

b) Zellvermittelte Reaktionen

In Bezug auf die Transplantatabstoßung, Graft-versus-host-Reaktion und der Allergie vom verzögerten Typ (DTH) zeigten die immundefizienten Tiere voll erhaltene T-Zellfunktionen (Lösch

1972). Allerdings konnte eine fehlende Gegenregulation der DTH-Kinetik nachgewiesen werden, da nach Sensibilisierung mit *Mc.tuberculosis* die Hautdickenzunahme bei DYS-Tieren nicht mehr zurückgebildet wurde (Fiedler et al.1981). Welche Zellfunktion bei den Kontrolltieren dafür verantwortlich ist, ist nicht bekannt.

Der Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest ergab, daß Lymphozyten von DYS-Tieren zur Rosettenbildung ähnlich den Kontrollen befähigt sind (Böhringer et al.1983).

Mit Hilfe der adoptiven Übertragung von histokompatiblen Lymphozyten wurde der Versuch einer Rekonstitution der IgG-Synthesefähigkeit dysgammaglobulinämischer Hühner durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Übertragung von Milz B- und T- bzw. T-Lymphozyten nicht zur Einstellung einer IgG-spezifischen T-Helfer-T-Suppressor-Homöostase führt. Eine kurzfristige Stimulation der Empfänger B_G-Zellen (Zellen, die auf ihrer Oberfläche IgG-positiv sind) manifestierte sich jedoch in der kurzfristigen IgG- und IgG-Antikörpersynthese nach Sensibilisierung der Empfänger mit HSA und FCA (Princz 1985).

c) Histologie

Histologische Untersuchungen ergaben keine Anomalien in den lymphatischen Organen (Lösch und Hoffmann-Fezer 1973). Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten eine schwache Reduktion der Ig-tragenden Lymphozyten bei Immundefekten Tieren in der Bursa, Milz und peripheren Blutlymphozyten. Die Anzahl der IgM- und IgA-positiven Zellen in den lymphatischen Geweben entsprach der Norm, während cytoplasmatisch IgG-positive Zellen völlig

fehlten (Hoffmann-Fezer and Lösch 1983).

d) Hämatologie

Hämatologische Untersuchungen während der ersten Lebensmonate ergaben keine Unterschiede im Verhältnis der verschiedenen Leukozytenpopulationen (unveröffentlicht). Ebenso zeigten Hämatokrit (Scheu 1978), Erythrozytenanzahl und Hämoglobingehalt (unveröffentlicht) keine Unterschiede zwischen Kontrollen und DYS-Tieren.

e) Fertilität

Dysgammaglobulinämische Hähne entwickeln sich normal und erreichen um den 6. Lebensmonat die Geschlechtsreife. Neben einem unterdrückten, zum Teil auch fehlenden Paarungsverhalten zeigen sie reduzierte Fertilität oder sind infertil. Dem entsprechen hochgradig hypoplastische Hoden, die Spermienkonzentration ist vermindert (Hannessschläger 1984). Verlaufsuntersuchungen über den Serum-Testosteron-Spiegel ergaben bei DYS-Tieren hohe Streuungen. Die Freisetzung des Luteinisierungshormons war in der Norm (Hannessschläger 1984; Schulz 1985).

1.2.2.2.3. Modellvorstellung über die UM-B19 Linie

Der hochgradige bis totale Serum IgG-Mangel bei erhöhten IgM- und IgA-Konzentrationen der DYS-Hühner ist mit einem hochgradigen bis totalen IgG-Antikörpermangel korreliert. Verschiedene Versuche aber zeigten eine grundsätzliche Fähigkeit zur IgG- und IgG-Antikörpersynthese. Auf Grund dieser Befunde wurde ein genetischer Block während der Ontogenese beim switch von der IgM- zur IgG-produzierenden Zelle ausgeschlossen. Die unter Keimfreihaltung erzielten Ergebnisse sprechen für eine B-Zellreifungsverzögerung

durch möglicherweise verändertes Mikroenvironment der Bursa. Die verzögerte Ausbildung IgG-bildender Zellen verursacht ihrerseits ein gestörtes IgG-spezifisches T-Helfer-T-Suppressorverhältnis, so daß die IgG-Bildung unterdrückt und durch fehlende Rückkopplung des IgG auf die B_M-Zellen eine Überproduktion von IgM ermöglicht wird. Aber auch ein defekter T-Helferfaktor, fehlende T-Zellhilfe sowie B-Zellrezeptordefekte sind als Ursache des Defektes nicht auszuschließen.

1.2.2.2.4. Selektiver IgG-Mangel beim Menschen

Ein fast identisches Erscheinungsbild der Dysgammaglobulinämie beim Menschen wurde von Hattori et al. 1981 beschrieben. Das Serum eines jungen Mannes mit schweren Infektionen zeigte neben erhöhtem IgA und IgM einen selektiven IgG-Mangel, obwohl ein normaler Prozentsatz von T-Zellen und Oberflächen-Ig-tragenden Zellen vorhanden war. Kokultur Studien zeigten, daß die T-Zellen des Patienten die Entwicklung cytoplasmatisch-IgG-positiver Zellen nach Stimulierung mit PWM unterdrückten, während die Entwicklung der IgA- und IgM-positiven Zellen normal verlief. Solche klassenspezifischen Suppressor-T-Zellen waren erstmals von Waldman et al. 1976 bei Patienten mit selektiver IgA-Defizienz beschrieben worden.

1.2.2.2.5. UCD 140 Hühnerlinie

Ein weiteres Tiermodell mit Dysgammaglobulinämie, die UCD 140 Hühnerlinie, wurde von Benedict und Mitarbeitern gefunden (Benedict et al. 1977). Diese Tiere haben bis circa 50 Tage nach Schlupf normale IgG-Spiegel, erst dann tritt die Dysgammaglobulinämie auf. Sie ist charakterisiert durch 7S-Ig-Defizienz mit erhöhtem

Serum-IgM und normal bis leicht erhöhtem IgA. Die proliferative Antwort der peripheren Blutlymphozyten auf T- und B-Zellmitogene in vitro, die DTH auf Tuberkulin, die serumhämolytischen Komplementspiegel erwiesen sich als normal, ebenso wie die Anzahl Ig-tragender Blutlymphozyten (Benedict et al.1980). Obwohl die UCD 140 Tiere nachhaltig IgM-Antikörper-Antworten auf T-abhängige Antigene machen, sind sie unfähig den switch zur 7S-Ig-Antikörpersynthese zu vollziehen. Außerdem hemmen ihre T-Zellen spezifisch die 7S-Ig- aber nicht IgM-Synthese PWM stimulierter Lymphozyten in vitro. Ferner wird in dieser Linie ein gehäuftes Auftreten von Autoimmunerkrankungen, z.B. in Form Coombs-Test positiver hämolytischer Anämien beobachtet (Montero et al.1979). Möglicherweise liegt der Defekt in der pränatalen Phase der Bursaentwicklung (Benedict et al.1981).

1.3.

Das Immunsystem des Huhnes

Die Vögel sind die ersten Vertebraten, bei denen eine klare Trennung der beiden Immunsysteme an Hand zweier Organe (Thymus, Bursa fabricii) etabliert ist (Warner et al.1962; Cooper et al. 1966). Durch chirurgische Entfernung der Bursa fabricii hatten Glick et al.1956 die Bedeutung des Organs für die antikörperbildenden Zellen demonstriert. Versuche zur neonatalen Thymektomie und humoralen Bursektomie zeigten eine Trennung der immunologischen Antwort (Cooper et al.1966; Warner 1967). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vermutet, daß beim Huhn Transplantations-Immunität und humorale Antikörperbildung zwei unabhängige Systeme der Immunantwort sind, die sich unter der Kontrolle zweier primärer lymphatischer Organe entwickeln, Thymus und Bursa.

Im Säugersystem wurde die Bedeutung des Thymus für die Entwicklung immunkompetenter Zellen von Miller (1961; 1963) und Good et al.1962 entdeckt.

Anatomisch unterscheidet sich der Vogel vom Säuger durch den Besitz der Bursa fabricii, besonderer darmassoziierten lymphoider Gewebe (Zäcaltonsillen, akzessorische Milzen) und der Teilung des Thymus in Lobi. Beachtenswert ist weiterhin eine diffuse lymphozytäre Infiltration des erwachsenen Thymus mit B-Zellen und der Bursa fabricii mit T-Zellen. Obwohl lymphatische Knoten vorhanden sind, insbesondere entlang der Extremitätengefäße, zeigen sie nicht die typische Organisation der Säugerlymphknoten (Fleischer 1981). Die für Säugetiere charakteristischen Körper- und Organlymphknoten sind nicht ausgebildet.

Auch im humoralen Bereich bestehen Unterschiede. Leslie und Clem (1969) schlugen die Bezeichnung IgY an Stelle von IgG

und Ambrosius und Hädige (1982) die Bezeichnung IgB für das IgA beim Huhn vor, da eine Kreuzreaktivität zwischen Hühner-Gallenimmunglobulin und dem IgA anderer Spezies nicht stattfindet. Bis zu einer endgültigen Klärung, ob zwischen den Immunglobulinen von Hühnern und Säugern definitiv Unterschiede bestehen, verwenden wir die gebräuchlichen Bezeichnungen IgG, IgM und IgA.

Daneben wurde das Vorkommen geringer Mengen eines unidentifizierten, hochmolekularen Immunglobulins im Hühnerserum beschrieben (Lebacqz 1979). Es zeigt keine Reaktion mit Antiseren gegen Hühner-H-Ketten (α , μ und γ) und stellt möglicherweise eine andere Immunglobulinklasse z.B. IgD oder IgE dar. Obwohl das Vorkommen von IgD bei Hühnern vermutet wird (Parkhouse and Cooper 1977) konnten keine weiteren Immunglobulinklassen bei Vögeln nachgewiesen werden.

Der Thymus ist die erste lymphoide Struktur, die im Embryo erscheint. Die Anlage entwickelt sich am zweiten Tag. Ab dem fünften Tag sind die ersten Thymuslobi sichtbar und einen halben Tag später verlieren sie ihre Verbindung mit dem Pharynx und liegen im Mesenchym. Ab dem zwölften Tag grenzen sich in den Loben zwei Zonen ab und am siebzehnten Tag des embryonalen Lebens ist die strukturelle Gliederung in Cortex und Medulla abgeschlossen, in letzterer sind die Lymphozyten stationiert.

Die Bursa fabricii, die erstmals 1621 von Fabricius beschrieben wurde, stellt ein lymphoepitheliales, nur den Vögeln eigenes Organ dar. Sie entwickelt sich am vierten Tag als epitheliale

Proliferation des kloakalen und kaudalen Endoderms. Das Bursa-primordium erscheint beim fünf Tage alten Embryo als endodermales Epithel der Aftermembran. Am Tag acht entstehen bursale Vesikel, die sich am zehnten Tag einfalten (Plicae). Ab Tag zwölf proliferiert das Bursaepithel. Am Ende der Brutzeit sind die bursalen Follikel gut entwickelt, jedoch findet die vollkommene Ausbildung von Cortex und Medulla erst nach dem Schlupf statt.

Mit Hilfe von Experimenten an Hühner-Wachtel-Embryo Chimären wurde gezeigt, daß die hämopoietischen Stammzellen der Erythro- und Lymphozyten "extrinsic bloodborne" sind, das heißt, daß intraembryonale Zellen über den Dottersack und das Blut in die lymphatischen Organe (Thymus, Bursa) einwandern (Le Douarin et al. 1976a, Dieterlen-Lievre et al. 1977, Lassila et al. 1982). Außerdem wurde beobachtet, daß die embryonalen Anlagen von Thymus und Bursa erst ab einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung dem Stammzelleninflux unterliegen, der Thymus zwischen Tag 6.5 - 8 und die Bursa von Tag 8 - 14 und zum Teil noch länger (Le Douarin et al. 1976b). Das zeigt, daß Thymus und Bursa für die Stammzellen nur zu bestimmten Zeiten der Entwicklung "attraktiv" sind, obwohl die Stammzellen im Blut schon vor und nach der Periode der physiologischen Anziehung vorhanden sind. Weitergehende Untersuchungen ergaben die Möglichkeit, daß sich eine einzige Stammzelle in vitro und in vivo sowohl zur B- als auch T-Zelle entwickeln kann (Eskola and Toivanen 1976, Jotereau et al. 1980). Möglicherweise verlieren die Stammzellen bei Einsetzen der Attraktivität der lymphoiden Organe ihre Pluripotenz.

In den zentralen lymphatischen Organen reifen die Stammzellen zu Lymphozyten. Im Thymus erscheinen die ersten Lymphozyten nach 8.5 Tagen (Lassila 1981). Am zwölften Tag besitzen sie eine terminale Deoxynucleotidyl-Transferase, ein Enzym, das für primitive T-Zellen als Marker dient (Sugimoto and Bollum 1979).

In der Bursa ist der erste Marker ein Ia-ähnliches B-Zellalloantigen. Die ersten Ia-positiven Zellen erscheinen in der Bursa am zehnten Tag. Die ersten Immunglobulin-positiven Zellen (cytoplasmatisches- und Oberflächen-IgM) treten in der Bursa am zwölften Tag auf, Oberflächen-IgG-positive Zellen erscheinen am Tag 14 und die ersten IgA-Zellen am 16.Tag der Embryonalentwicklung (Kincade and Cooper 1971; Lassila 1981). Die Differenzierung der B-Lymphozyten zu den B-Zellklonen erfolgt über IgM-synthetisierende Zellklone, aus denen nach circa 20 Generationen IgG-produzierende Zellen und IgA-bildende Klone hervorgehen (Cooper et al.1972). Der Switch von IgM zu IgG ist nur in der Bursa möglich (Glick 1977), während der Switch zu IgA auch in der Peripherie vor sich gehen kann (Martin and Leslie 1974). Die nacheinander folgende Ausbildung von IgM-IgG-IgA bildenden Zellen wird durch das zeitlich unterschiedliche Auftreten der verschiedenen Ig-positiven Zellen in der Peripherie reflektiert (Kincade and Cooper 1973). Alternativ dazu wurde postuliert, daß IgA-Zellen direkt aus IgG-Zellen entstehen können (Leslie 1975, Hoffman-Fezer und Lösch 1983).

Die differenzierten und nun immunkompetenten Zellen in Thymus und Bursa wandern über das Blut zu den peripheren lymphatischen Organen. Der Beginn der antigen-unabhängigen B-Lymphozy-

ten Emigration liegt am 18. Tag, also vor dem Schlupf (Kincade and Cooper 1971, Ivany and Shand 1973). Die IgM-tragenden Zellen gelangen als erste in das Blut, gefolgt von IgG- und IgA-Zellen. Die Fähigkeit zur vollkommenen Immunantwort ist beim Schlupf aber noch nicht erreicht, da die Besiedlung der verschiedenen Gewebe mit Lymphozyten nicht zur gleichen Zeit und in unterschiedlichem Ausmaß erfolgt (Hudson and Roltt 1973, Albini und Wick 1974, Toivanen et al.1974).

Die immunologische Reife, d.h. auf Antigene mit entsprechenden Gammaglobulinkonzentrationen adulter Tiere antworten zu können, wird nach Martin und Leslie 1973 in der 13. Woche erreicht. Neuere Arbeiten über T-Oberflächenmarker zeigten, daß parallel zur in vivo Differenzierung der T-Subpopulationen, über einen Zeitraum von circa 10 Wochen nach Schlupf, die mitogene Antwort in vitro einhergeht (Traill et al.1984).

Trotz der Unterschiede des Immunsystems von Säuger und Huhn konnten die meisten Lymphozyteninteraktionen, die bei der Maus gefunden wurden, auch beim Huhn nachgewiesen werden. Der Synergismus zwischen T-, B-Lymphozyten und Makrophagen in der primären Immunantwort gegen Schäfererythrozyten wurde in vivo (Mc Arthur et al.1973) und in vitro (Evans and Invanyi 1974) demonstriert, ebenso wie die Carrier-spezifische T-Zellhilfe bei der humoralen anti-Haptenantwort (Weinbaum et al.1973). Natürliche Killerzellen (Fleischer 1980), zellvermittelte-Cytotoxizität (Kirchner and Blaese 1973) sowie die Bildung von Interleukin 1 (Hayari et al.1982) und Interleukin 2 (Schauenstein et al.1982,

Schnetzler et al. 1983) konnten im Hühnersystem nachgewiesen werden. In jungen Hühnerthymus wurden immunregulatorische Zellen (vor allem Suppressor-Zellen) gefunden, die die T- und B-Zellantwort nach Transfer in syngene oder allogene Rezipienten unterdrückten (Droege 1976, Moticka 1977). Daneben erzeugten Lymphozyten von Hühnern, die in Folge chemischer oder chirurgischer Bursektomie eine Agammaglobulinämie aufwiesen, in normalen Tieren die sogenannte "infektiöse Agammaglobulinämie" (Blaese et al. 1974), was darauf hinweist, daß die Bildung von Suppressorzellen beim Huhn bursaabhängig ist. Bursektomieversuche während der Embryogenese und nach dem Schlupf bestätigten die Bedeutung der embryonalen Bursa für die Ausprägung der verschiedenen Immunglobuline und für den Serumgehalt in adulten Tieren (Leslie 1975).

Somit sind zelluläre und humorale Immunantworten beim Huhn trotz der eindeutigen Trennung ihrer Differenzierungsorgane, Thymus und Bursa, nicht echt isolierte Systeme, sondern es finden wie beim Säuger Interaktionen statt.

1.4. Purinstoffwechsel

Purinnucleotide können de novo aus einfachen Vorstufen (Aminosäuren) oder über den salvage-pathway aus vorgegebenen Nucleo-

siden und Basen, die aus der Nahrung stammen oder Produkte des RNA- oder DNA-Abbaues sind, synthetisiert werden. Hauptsyntheseort der Purine beim Menschen ist die Leber. Die Mononucleotide sind in die Feed-back-Regulation involviert, die über die Amido-Phosphoribosyltransferase sowohl den Purin-salvage-pathway als auch die Pyrimidin de novo Synthese hemmt.

Zahlreiche in vivo und in vitro Studien an Mensch und Tier ergaben, daß Purinanaloge als Regulatoren verschiedener Immunfunktionen agieren können. So stimuliert Adenosin in niedriger Konzentration sowohl die Lymphozytentransformation als auch die Antikörpersekretion (Seegmiller et al.1977), während es in hohen Konzentrationen auf diese Funktionen hemmend wirkt (Hirschhorn and Sela 1977). Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, daß erhöhte Antikörperproduktion oft von hoher Adenosindesaminase (ADA)-Aktivität begleitet ist (Hall 1963). Darüber hinaus bindet Adenosin in vitro an Thymozyten und stimuliert so die Adenincyclase, was zu einem Anstieg der intrazellulären cyclo-AMP-Konzentration führt (Astaldi et al.1977). Dies wiederum führt zur Aktivierung von Proteinkinasen, die für die Phosphorylierung von Proteinen und die Derepression von Genen verantwortlich sind.

1972 entdeckten Giblett et al. bei 2 Mädchen mit SCID einen vollständigen Mangel an Adenosindesaminase (ADA) der Erythrozyten und postulierten daraufhin einen kausalen Zusammenhang zwischen dem genetischen Defekt des Purinstoffwechselenzyms und der kombinierten B- und T-Zelldefizienz. Inzwischen bestätigten weitere Arbeiten, daß mehr als 20% der Patienten mit autosomaler, rezessiver SCID einen genetisch festgelegten Defekt der ADA aufweisen,

der in vitro sowohl eine Hemmung der T- und B-Zellreife als auch eine Selbstzerstörung differenzierter Zellen nach Antigenstimulation zur Folge hat (Hirschhorn 1977). Patienten mit ADA-Defizienz haben neben geschwächten Antikörper- und zellvermittelten Antworten erhöhte Deoxyadenosinspiegel im Plasma und Urin (Kuttesch et al.1978). Dieser Metabolit kann über allosterische Regulation die Ribonucleotid-Reductase hemmen, und somit die Synthese anderer Deoxynucleosid-Triphosphate reduzieren.

Inzwischen wurden bei Immunkrankheiten weitere Enzymdefekte im Purinstoffwechsel nachgewiesen, so z.B. die Purin-Nucleosid-Phosphorylase (PNP)-Defizienz bei Patienten mit defekter T-Zell-Immunität aber anscheinend normaler B-Zellfunktion (Ammann 1979). Generell zeigen PNP-defiziente Patienten Lymphopenie, verminderte Antwort auf Phytohämagglutinin (PHA), aber normale Anzahl Ig-tragender Zellen und Antikörpermengen (Rich et al. 1980). Die Inosinkonzentration in Plasma und Urin ist erhöht, während niedrige Harnsäurespiegel im Plasma beobachtet wurden (Cohen et al.1976).

Ein weiteres Enzym, die 5'-Nucleotidase (5'-NT), katalysiert den ersten enzymatischen Schritt des Purinnucleotid-Abbaus zu den korrespondierenden Nucleosiden. Ein Teil der 5'-NT-Aktivität ist auf der Zelloberfläche lokalisiert und wird als ecto-5'-NT bezeichnet. Intrazellulär liegt das Enzym löslich vor (Carson et al.1981). Verminderte Aktivität der ecto-5'-NT wurde in Lymphozyten von Patienten mit X-chromosomaler Agammaglobulinämie (Edwards et al.1979) und Hypogammaglobulinämie (Webster et al.1978) gefunden. Die ecto-5'-NT-Defizienz scheint kein primärer

genetischer Defekt sondern die Folge einer verminderten Zellreife zu sein (Webster et al.1978).

Beim Lesch-Nyhan-Syndrom ist die Hypoxanthin-Guanosin-Phosphoribosyl-Transferase(HGPRT)-Aktivität vermindert oder fehlt völlig. Die Patienten zeigen normale T- aber verminderte B-Zellantworten (erniedrigte IgG-Konzentration), ihre Reaktion auf mitogene oder antigene Stimulierung in vitro aber ist normal (Allison et al. 1977).

Neben weiteren Störungen von Purinstoffwechselezymen (z.B. Xanthinoxidase, Adenin-Phosphoribosyltransferase) haben beim Menschen auch noch andere Enzymdefekte (z.B. Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase, Glucose-6-Phosphatase und Fructose-1-Aldolase) Auswirkungen auf den Purinstoffwechsel und somit indirekt auf die Immunfunktionen (Henderson 1972).

Fünf mögliche Mechanismen, die zur Immundefizienz führen, wurden vorgeschlagen, wobei Parameter, wie Proliferationskapazität, Immunglobulinsynthese und Immunkompetenz in Erwägung gezogen wurden:

a. Durch Phosphorylierung zu seinen Nucleotiden ist Adenosin in der Lage Phosphat abzufangen. Unter physiologischen Bedingungen hat die Abnahme von intrazellulärem Phosphat die Hemmung der PRPP-Bildung (Parker et al.1982) und damit eine Verminderung der Pyrimidinnucleotide mit gleichzeitiger Anhäufung von Orotsäure zur Folge. Green and Chan 1973 postulierten, daß die toxische Wirkung von Adenosin auf der Verminderung der Pyrimidine beruhe.

b. Da PRPP ein wichtiges Substrat sowohl des Purin-salvage, als auch für die Purin und Pyrimidin de novo Synthese ist, hat die Abnahme von PRPP Konsequenzen für die verschiedensten Purin- und Pyrimidinnucleotide (Planet and Fox 1976)

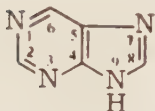
c. Sowohl Adenosin als auch Deoxyadenosin hemmen die S-Adenosyl-Homocysteindehydrolase und somit die S-Adenosyl-Methionin abhängigen Methylierungsreaktionen (Johnston and Kredich 1979). Sie spielen somit wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei den Immundefizienzen. Die genaue Bedeutung dieses Schrittes ist aber noch nicht geklärt.

d. Hohe Konzentrationen von Deoxy-ATP und Deoxy-GTP hemmen die Ribonucleotid-Reductase allosterisch. Da dies in Säugerzellen der einzige bekannte Weg der Desoxyribonucleotid-Synthese ist, ist ihre Funktion für die DNA-Synthese essentiell (Reichard 1972).

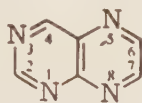
e. Adenosin induziert das Ansteigen von intrazellulärem c-AMP, wodurch sowohl die Lymphozytenblastogenese gehemmt als auch die Antikörpersekretion und Lymphozyten-vermittelte Toxizität beeinflußt wird (Smith et al. 1971a; Carson and Seegmiller 1976).

1.5. Pteridine

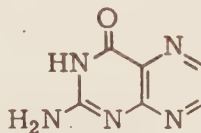
In vielen Eigenschaften gleichen die Pteridine den Purinen. Sie sind Biheterocyclus, viele sind bei pH 7 schwerlöslich und besitzen charakteristische UV-Spektren.



Purin



Pteridin



Pterin

Untersuchungen zur Biosynthese der Pteridine zeigten, daß Bakterien, Pilze, Amphibien und Insekten Purinvorstufen in den Pteridinring einbauen können (Shiota et al.1971). Den direkten Beweis, daß Guanosin den unmittelbaren Vorläufer der Pteridine darstellt, erbrachte Brown 1971 durch die Isolierung der Guanosintriphosphat (GTP)-Cyclohydrolase aus E.coli. Dieses Enzym wandelt GTP limitierend zu D-erythro-7,8-Dihydroneopterin-3'-Triphosphat dem Ausgangsprodukt des Pteridin- und Folsäurestoffwechsels um. In einer Reihe von Untersuchungen wurde gezeigt, daß Pteridine sowohl in vitro durch Rattenleberhomogenat (Rembold et al.1969; Rembold et al.1971a), als auch in vivo nach intraperitonealer Injektion bei der Ratte (Rembold et al.1971b) in ähnlicher Weise abgebaut werden. Abhängig von der Beteiligung der Pterin-Desaminase, endet der Pterinabbau auf der Stufe einfacher Lumazine oder Pterine. Pterin und Lumazin sind gleichwertige Sub-

strate für die Xanthinoxidase. Beide Pteridine werden vom Enzym an C-7 hydroxyliert, woraus Isoxanthopterin entsteht (Rembold and Gyure 1972). Im Falle der 7,8-Dihydroverbindungen wird dagegen an C-6 oxidiert (Rembold and Gutensohn 1968) woraus Xanthopterin entsteht. Außerdem fand Forrest et al. 1956 bei einer Mutante von *Drosophila*, welcher die Xanthinoxidase fehlt, nur Pterin als Abbauprodukt, während der Wildstamm Isoxanthopterin enthielt.

Über die Rolle der Pteridine herrschte lange Unsicherheit. Bekannt war ihr Einfluß auf das Entwicklungsgeschehen. So zeigen Insekten im Verlauf des Puppenstadiums deutliche Veränderungen in der Konzentration und der Zusammensetzung der Pteridinmetabolite, deren Funktion nicht geklärt ist (Ziegler 1965). Bei *Oncopeltus* wirken sich Xanthopterin und Isoxanthopterin negativ auf die Entwicklung im Ei aus (Harris and Forrest 1967). Außerdem nimmt bei Amphibien in der ersten Periode der Larvalentwicklung und der Differenzierung sowie mit dem Beginn der Metamorphose die Pteridinkonzentration stark zu (Ziegler 1965).

1960 konnte Ziegler in den Augen und der Haut von Amphibien und in Insektenaugen neben Biopterin eine äußerst lichtempfindliche Substanz, das Tetrahydrobiopterin, nachweisen. Nachdem es gelungen war, Tetrahydrobiopterin als Cofaktor einiger mischfunktioneller Oxigenasen nachzuweisen, hatte man eine Stoffwechselfunktion der hydrierten Pterine erkannt (Kaufman and Fisher 1962). Es wird in Metazoen für die Hydroxylierung von Phenylalanin, Tyrosin, Thryptophan und somit für die Bildung von Neurotransmittern benötigt. Entsprechende Stoffwechseldefekte treten beim Menschen auf und sind teilweise einer Therapie mit Tetrahydrobiopterin zugänglich (Kaufman 1979). Durch Arbei-

ten von Tietz et al.1964 und Pflieger et al.1967 wurde auch eine Cofaktor-Rolle von Tetrahydrobiopterin bei der Spaltung von Glyceryläthern zu Fettsäuren und Fettalkoholen sehr wahrscheinlich.

Die im Verlauf der letzten Jahre festgestellte erhöhte Neopterin-ausscheidung bei Tumorpatienten, bei viralen Erkrankungen und bei Abstoßungsreaktionen (Hausen und Wachter 1982), sowie Erhöhung im Biopterinspiegel des Blutes, erhöhte Ausscheidung von 6-Hydroxyformylpterin bzw. 6-Formylpterin (Halpern et al.1977) und erhöhte Spiegel von Tetrahydrobiopterin im Blut (Ziegler and Kokolis 1979) von Tumorpatienten führten zu der Vermutung, daß Pteridine im Verlauf der Immunproliferation gebildet werden. Eine Bestätigung dieser Hypothese ergab sich durch die Freisetzung von Neopterin in allo-antigen-aktivierten Lymphozyten (Fuchs et al.1982; Huber et al.1983), durch eine Erhöhung des lymphozytären Biopterinspiegels im Verlauf von graft versus host Reaktionen (Fink et al.1983), sowie durch in vitro Versuche bei lektin-stimulierten Lymphozyten (Ziegler 1986)

Es zeigte sich, daß Pteridine nicht nur im Verlauf der Lymphozytenaktivierung gebildet werden, sie scheinen darüber hinaus auch bei der Regulation dieses Vorganges beteiligt zu sein, dies gilt besonders für Tetrahydrobiopterin, einem Modulator der lektin-induzierten Aktivierung (Ziegler et al.1983). Es wurde zwar inzwischen eine positive Modulation der Interleukin 2 (Il-2)-Aktivität (Ziegler et al.1984) und damit ein möglicher Angriffspunkt genauer definiert, die Wirkungsweise jedoch bleibt noch offen. Es ist daran zu denken, daß die oben erwähnte Freisetzung von ungesättigten Fettsäuren (Tietz et al.1964; Pflieger

et al.1967), welche mit der lektin-induzierten Mitose verbunden ist (Bailey et al.1982), eine Rolle spielen könnte.

1969 definierten Dumonde et al. die Kriterien für Lymphokine folgendermaßen: Sie sind lösliche Faktoren, sie werden von antigen-aktivierten Lymphozyten produziert, sie sind unterschiedlich von den klassischen Antikörpern, sie sind Verstärker, Regulatoren und Mediatoren der Immunantwort. Somit erfüllen die Pteridine alle Kriterien der Lymphokine:

- a. sie werden von Lymphozyten gebildet
- b. sie sind selbst nicht mitogen
- c. vier reduzierte Anabolite greifen als Co-Stimulatoren, zwei Katabolite als Hemmstoffe in den Verlauf der ConA-Stimulation ein (Ziegler et al.1983)
- d. die Wirkung der einzelnen Pterinmetabolite ist ausgesprochen struktur- und stereospezifisch

Wie oben erwähnt gibt es Hinweise, daß z.B. Tetrahydrobiopterin die Aktivität eines dieser Lymphokine (Il-2) moduliert.

1.6. Xanthinoxidase, ein kataboles Enzym der Purine und Pteridine

Die Xanthinoxidase war das erste Metalloflavoprotein, das isoliert, gereinigt und kristallisiert wurde. Sie ist ein Dimer mit einem Molekulargewicht von circa 300 000 Dalton. Jedes Enzymmonomer enthält neben einer Flavineinheit ein Mol Molybdän und zwei verschiedene Fe_2S_2 -Zentren als prosthetische Gruppe

(Coughlan et al.1979). Die Xanthinoxidase wurde sowohl in löslicher als auch membran-gebundener Form beschrieben (Bruder et al.1982)

In Säugergeweben kommt das Enzym hauptsächlich als NAD⁺-abhängige Dehydrogenase (D-Form) vor, das in reduzierter Form Elektronen auf NAD⁺ oder andere Stoffe übertragen kann. In der Milch dagegen herrscht die O₂-abhängige Oxigenase (O-Form) vor (Bruder et al.1983). Die in Rattenleberhomogenaten vorkommende D-Form kann irreversibel durch Proteolyse oder reversibel durch Reagenzien für die Thiolgruppe in die O-Form umgewandelt werden (Battelly et al.1972). Im Gegensatz zur Dehydrogenase der Vögel ist die D-Form beim Säuger immer von Oxidase-Aktivität begleitet (Krenitsky and Tuttle 1978). Wie die Transformation der D- zur O-Form in vivo erfolgt ist nicht geklärt. D- und O-Form sind weder mit Hilfe von Absorptionsspektren, Acrylamid-gel-Elektrophorese, Verhalten gegenüber Cyanid und Arsenit (Waud and Rajagopalan 1976) noch mit monoklonalen Antikörpern (Bruder et al.1983) voneinander zu unterscheiden.

Die Xanthinoxidase (XOD)/Dehydrogenase (XDH) ist das Endenzym des Katabolismus der Purine bei Mensch und Vogel. In vitro oxidiert das Enzym Purine, Aldehyde, Pteridine ebenso wie NADH (Bruder et al.1982). Neben chemischen Inhibitoren, wie z.B. Allopurinol (Watts et al.1965), wirken auch ihre Produkte (z.B. Harnsäure, Xanthin, oder NADH) hemmend auf ihre Aktivität (Kaminsky and Jezewska 1979). Wieland und Liebig zeigten 1944, daß die Xanthinoxidase auch Pteridine umsetzen kann. Dies wurde von Hofstee 1949, Lowry et al.1949 und Kalckar et al.1950 bestä-

tigt. Massen- und Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen des molybdänhaltigen Cofaktors der Xanthinoxidase zeigten die Anwesenheit von 2 fluoreszierenden Pterinen (Claassen et al.1984; Johnson et al.1984). Aus dem Vorkommen eines Pterincofaktors in Molybdoenzymen ergibt sich die spezielle Situation, daß ein Pterin als Enzymbestandteil für die Modifizierung anderer Pteridine notwendig ist, so metabolisiert z.B. die pterinhaltige Xanthindehydrogenase in *Drosophila* das Substrat 2-Amino-4-Hydroxypteridin zu Isoxanthopterin (Forrest et al.1956).

Die Xanthinoxidase zeigt bei der Maus (Lee 1973) und auch beim Huhn (Morgan 1930; Murison 1969) während der Entwicklung vom Embryo zum adulten Tier sowohl starke Veränderungen in ihrer Aktivität als auch unterschiedliche Gewebsspezifitäten (Watts et al.1965). Morgan (1930) konnte in Hühnerembryonen bis zum 15.Tag nur im Dottersack Aktivität der XOD/XDH nachweisen, dann trat sie in den Nieren auf, während sie in der Leber bis zum Schlupf (21.Tag) nicht nachweisbar war. Solche Phänomene wurden auch für andere Enzyme (z.B. Carbamylphosphat-Synthetase, Ornithin-Transcarbamylase u.a.) bei anderen Tieren beschrieben (Solomon 1958; Brown et al.1959).

Diese Veränderungen können auf verschiedenen Ursachen basieren, so auf den Wegfall eines Inhibitors oder das Erscheinen eines Aktivators, Konformations- oder assoziierende Änderung des schon vorher existierenden Moleküls, Zunahme der de novo Syntheserate oder Abnahme der Abbaurate. Am wahrscheinlichsten ist der limitierende Schritt der Xanthindehydrogenase-Synthese, die Verbindung des Cofaktors mit dem Apoenzym, da Defizienzen von Riboflavin, Molybdän oder Eisen den Gehalt des aktiven Enzyms sowohl bei Ratten als auch Hühnern (Knox and Greengard 1965; Kelley and Amy 1984) vermindern.

In harnsäureausscheidenden Tieren ist die XDH-Aktivität deutlich von der Ernährung abhängig. So erhöht sich ihre Aktivität in der Hühnerleber circa um das 13fache, wenn der Caseingehalt des Futters von 5 auf 75% erhöht wird (Itoh and Tsushima 1974). Das Enzym ist durch Substrate induzierbar, aber bei hungernden Hühnern erwiesen sich nur Inosin und nicht die freien Purine als aktiv (Stirpe and Della Corte 1965). Außerdem vermindern nahrungsinduzierte Eisen- oder Molybdändefizienzen die Aktivität der Leber-XOD von Tieren.

Morgan zeigte bereits 1926, daß die Xanthinoxidase einer besonderen Verteilung unterliegt, da sie gewebs- und artspezifisch stark in ihrem Vorkommen variiert. Diese Ergebnisse wurden sowohl mit Hilfe eines radioaktiven Assays (al-Khalidi and Chaglassian 1965) als auch mit monoklonalen Antikörpern (Bruder et al.1983) bestätigt. So kommt das Enzym beim Menschen vor allem in der Leber und den Nieren vor und fehlt in Leukozyten völlig (al-Khalidi and Chaglassian 1965; Watts et al.1965; Scholar and Calabresi 1973; Peters and Veerkamp 1983).

Veränderungen der Xanthinoxidase-Aktivität wurden bei verschiedenen Krankheiten beobachtet. So ist die Aktivität bei verschiedenen Hepatomen und anderen Tiertumoren vermindert (Prajda et al.1976), oder während bakterieller oder Protozoeninfektionen bei Mäusen in der Leber vorübergehend erhöht (Tubaro et al. 1980). Beim Menschen tritt auch die Xanthinurie, eine genetische Defizienz der Xanthinoxidase auf (Engelman et al.1964; Gibbs et al.1976), über deren genetische Kontrolle nichts bekannt ist (McKusick and Ruddle 1977).

2. Problemstellung

In der Literatur wurden verschiedenartige Störungen des Immunsystems beschrieben, die zur gestörten Immunglobulinproduktion (A-, Hyper-, Hypogammaglobulinämie oder selektivem Ig-Mangel) führen. Über die primären genetischen Defekte, die diesen Immundefizienzen zu Grunde liegen ist wenig bekannt.

Das Erscheinungsbild der "common variable immunodeficiency" umfaßt genetisch unterschiedliche Defekte. Die verschiedenen Formen der CVID sind bis heute nicht eindeutig voneinander abzugrenzen. Beim Menschen wurden bis jetzt sowohl Störungen der B-Zellanzahl, der B-Zellreifung, der Immunglobulinsekretion, der Antwort auf Mitogene in vitro sowie veränderte T-Zellregulation nachgewiesen. Als Ursache wurden Defekte der B-Zellreifung, hohe Suppressor-Aktivität, defekte Helferzellaktivität, Anwesenheit von Serum- oder Gewebsinhibitoren sowie Stoffwechselstörungen nachgewiesen.

Für die vorliegende Arbeit wurde das Huhn als Versuchstier gewählt, da eine dysgammaglobulinämische Hühnerlinie (UM-B19) zur Verfügung stand, die Ähnlichkeit mit CVID-Patienten aufweist. Wegen der grundsätzlichen Fähigkeit zur IgG- bzw. IgG-Antikörpersynthese wurde für die dysgammaglobulinämischen Tiere eine B-Zellreifungsverzögerung durch möglicherweise verändertes Bursamikroenvironment und daraus resultierendem gestörten T-Helfer-T-Suppressorverhältnis postuliert.

Zur weiteren Charakterisierung der Dysgammaglobulinämie bei UM-B19 Hühnern sollen in vitro Untersuchungen an Lymphozyten unternommen werden. Dazu müssen die benötigten Untersuchungsmethoden zum größten Teil für "das Huhn" erst etabliert und modifiziert werden.

Zur Überprüfung der verschiedenen Parameter wird zuerst ein optimales Kultursystem erstellt. Das Verhalten der DYS-Lymphozyten gegenüber verschiedenen Mitogenen soll erste Anhaltspunkte über Veränderungen innerhalb der Lymphozytenpopulationen erbringen. In Kokultur- und Überstandsexperimenten wird der Frage nach einer erhöhten Suppressoraktivität in immundefekten Hühnern nachgegangen. Untersuchungen über Purin- und Pteridinmetaboliten in Lymphozyten und deren Kulturüberständen sollen klären, ob der Immundefekt mit Stoffwechseleränderungen einhergeht. Dabei werden besonders die Enzyme des Purinstoffwechsels betrachtet.

Die Resultate über Kulturmethode, zelluläre Aktivitäten, Purin- und Pteridinmetaboliten, sowie über die Enzymaktivitäten des Purinstoffwechsels in Lymphozyten von Kontroll- und dysgammaglobulinämischen Hühnern werden in der vorliegenden Arbeit vorgestellt und diskutiert. Weiterhin wird versucht, das Erscheinungsbild der Dysgammaglobulinämie und die darüber herrschende Modellvorstellung mit den erzielten Ergebnissen in Einklang zu bringen. Es wird der Frage nachgegangen, inwieweit Veränderungen der Xanthindehydrogenase-Aktivität und damit des Purin- und Pteridinkatabolismus Auswirkungen auf den Immunstatus haben können.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Tiermaterial

3.1.1. UM-B19 Hühner, die auf dem Haupthistokompatibilitätslocus Homozygotie aufweisen.

Nach dem Serumimmunglobulinmuster eingeteilt in

- a. permanent dysgammaglobulinämische Tiere (DYS) mit gegenüber der Norm extrem niedrigen IgG-Konzentrationen bei erhöhten IgM- und IgA-Werten
- b. normogammaglobulinämische Tiere (NO) mit den der Norm entsprechenden IgG- und IgM-Konzentrationen sowie leicht erhöhten IgA-Werten.

3.1.2. nicht typisierte, immunologisch intakte Leghorn Hühner beiderlei Geschlechts als Kontrolltiere (KO).

Das Alter der Tiere betrug zwischen drei und sechs Monaten. Die Versuchstiere wurden unter gleichen Bedingungen aufgezogen. Die Haltung erfolgte in kleinen Gruppen auf Gitterrosten. Handelsübliches Junghennenalleinfutter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.2. Lymphozytengewinnung

3.2.1. Blutentnahme

Aus der Vena jugularis wurden 5 ml Blut mit Hilfe einer Einmalspritze, die verdünntes Liquemin (250 IU, Hoffman La Roche AG, Basel, Schweiz) enthielt, entnommen.

3.2.2. Langsamzentrifugation (Lee 1974)

5 ml heparinisiertes Blut wurden mit 1 ml Kulturmedium RPMI 1640 (ohne Glutamin, mit NaHCO_3 , Biochrom KG, Berlin) vermischt und eine halbe Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Suspension 15 min bei 35 x g zentrifugiert (Tischzentrifuge TJ6, Beckman, München) und der leukozytenreiche Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 resuspendiert, dreimal bei 400 x g (Damon/IEC-Zentrifuge, Modell RR-J) gewaschen, in Medium aufgenommen und gezählt (siehe 3.2.4.).

3.2.3. Ficoll-Gradient (Böyum 1968)

10 ml Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden in Zentrifugenröhrchen mit der gleichen Menge (1:2 mit RPMI 1640 verdünnten) Blut vorsichtig überschichtet und bei 18°C und 400 x g 20 min zentrifugiert. Die Leukozytenschicht zwischen Ficoll-Paque und darüberstehendem verdünntem Plasma wurde sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgehoben. Die abgehobenen Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen mit RPMI 1640 auf 10 ml aufgefüllt, resuspendiert und mit 400 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

3.2.4. Bestimmung der Anzahl lebender Lymphozyten
(Natt and Herrick 1952)

20 µl Zellsuspension wurden 1:2 mit Trypanblau (Biochrom, Berlin) vermischt und die lebenden Zellen (nach lebend - tot - Färbung) in der Neubauerkammer ausgezählt.

3.3. Kultivierung

3.3.1. Material

Am Tag der Zellisolierung (Tag 0) wurden $2,5 \times 10^7$ Zellen/10 ml Kulturmedium* (RPMI 1640 mit 2 mmol/l L-Glutamin, Biochrom KG, Berlin; 100 IU/ml Penicillin u. 100 µg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin; 10% inaktives fötales Kälberserum, Paesel, Frankfurt) entweder in Einmalröhrchen (Falcon, München), Petrischalen (Ø 10 cm, Nunclon, Dänemark) oder in Kulturflaschen (3013 F, Falcon Plastics Interchem, München) überführt.

3.3.2. Kultivierung

Die Zellkulturen wurden bei 39 °C, circa 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am Tag drei wurden 3 ml Medium vorsichtig den Flaschen entnommen und durch 3 ml frisches Kulturmedium* (mit Serum- oder anderen Zusätzen) ersetzt (Fütterung an Tag 3).

Ungefütterte Zellen wurden von Tag 0 bis Tag 6 nicht mit neuem Medium versehen.

An Tag 6 wurden die Zellen resuspendiert, in Einmalröhrchen überführt und bei 18 °C und 400 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Kulturmedium* resuspendiert. Die lebenden Zellen wurden ausgezählt (3.2.4.) und die Suspension auf 1×10^6 /ml lebende Zellen eingestellt. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden mit einer Eppendorfpipette dreifach in eine Mikrotitrationsplatte (96-Löcher, Nunclon, Dänemark) überführt und mit weiteren 100 µl Kulturmedium* aufgefüllt.

Mit einer Dosierspritze wurde 1 μCi ^3H -Thymidin (^3H -Tdr, spez. Aktivität 16,2 Ci/mmol, New England Nuclear, England) pro Mikrowell zugesetzt. Die Markierungsdauer betrug im Brutschrank 18 Stunden.

Die Ernte der Zellen aus den Mikrotitrationsplatten erfolgte mit einem Titertek-Cell-Harvester (Flow Lab.GmbH, Meckenheim) über Glasfiterfilter (Flow Lab.GmbH, Meckenheim). Die Filterplättchen wurden im Trockenschrank eine halbe Stunde getrocknet und in Kunststoffzählfläschchen (Zinsser, Frankfurt a.Main) gegeben. Danach wurden 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 212, Zinsser, Frankfurt a.Main) dazugegeben und kurz aufgeschüttelt. Der radioaktive Einbau wurde in einem Szintillationszähler (Pakard, Frankfurt a.Main) ermittelt.

3.3.3. Mediumzusätze

3.3.3.1. Verschiedene Mediumzusätze

Zur Verbesserung der Überlebensrate nach 6-tägiger Kultivierung und höheren Thymidineinbauraten nach Stimulierung wurden den Kulturen an Tag 0 verschiedene Zusätze zugegeben:

inaktives fötales Kälberserum (FCS, Paesel, Frankfurt a.Main)

inaktives Hühnerserum (HS, Gibco, BCK Biocult, Karlsruhe)

inaktives Serum von dysgammaglobulinämischen Hühnern (D-HS)

inaktives Serum von agammaglobulinämischen Hühnern (A-HS)

Ovalbumin (Sigma, Taufkirchen)

Glucose (Merck, Darmstadt)

L-Thyroxin (Henning Berlin GmbH, Berlin)

2-Mercaptoaethanol (Merck, Darmstadt)

Hepes-Puffer (Biochrom KG, Berlin)

3.3.3.2. Gewinnung und Inaktivierung von Serum

Vollblut wurde 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Das Serum wurde abpipetiert, bei 56 °C für 30 min im Wasserbad inaktiviert und anschließend bei 10 000 x g (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) für 20 min zentrifugiert.

3.3.3.3. Herstellung von Immunglobulin-freiem Serum (Glick and Sadler 1961; Weidanz et al.1976)

Agammaglobulinämie wurde induziert, indem man 3 Tage bebrütete Eier für 5 Sekunden mit dem spitzen Ende nach unten in eine 5 °C kalte 2,5% Testosteronpropionatlösung (Serva, Heidelberg) tauchte. Am Tag des Schlüpfens und den drei folgenden Tagen wurde den Küken 2 mg Cyclophosphamid/Tier/Tag (Endoxan, Asta-Werke AG, Bielefeld) i.m.injiziert. Die Plasmainmuglobulinspiegel wurden nach 4 Wochen mit der einfachen radialen Immundiffusion (Mancini et al.1965) und mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Schranner et al.1982) bestimmt. Hühner mit weniger als 0.1% des normalen Immunglobulinspiegels (IgG 10 mg/ml, IgM 1.5 mg/ml, IgA 0.4 mg/ml) wurden als agammaglobulinämisch bezeichnet.

3.4. Zelluläre Aktivitäten

3.4.1. Mitogene Stimulierung

Zu 10 ml Zellsuspension ($2,5 \times 10^7/10\text{ml}$) in Vollmedium* wurden an Tag 0 verschiedene Mitogenkonzentrationen zugegeben und

nach 6 Tagen der radioaktive Einbau von ^3H -Tdr bestimmt.

Folgende Mitogene wurden verwendet:

PWM: Pokeweed Mitogen (Gibco BCK Biocult, Karlsruhe)

Con A: Concanavalin A (salzfrei, Sigma, Taufkirchen)

LPS: Lipopolysaccharid von *Salmonella typhosa* (Difco Lab. Detroit/USA)

PHA: Phytohämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris* (Wellcome Res.Lab.Beckman, England)

Als Kontrollen dienen Ansätze ohne Mitogen. Aus den Dreifach-Werten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen und aus den Mittelwerten die Stimulationsindices berechnet.

$$\text{Stimulationsindex (Si)} = \frac{\text{cpm (Proben mit Mitogen)}}{\text{cpm (Proben ohne Mitogen)}}$$

3.4.2. Plastikadherenz

10 ml Zellsuspension wurden in Falcon-Flaschen 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgossen, die darin befindlichen (nicht adherenten) Zellen gezählt und nach 6-tägiger Kultivierung mit PWM (100 µl/10 ml) der Stimulationsindex bestimmt.

3.4.3. Zelltrennung über Nylonwolle

Die Nylonwolle (Scrubbed nylon fiber, 3 denier, 3,81cm Typ 200, Fenwal Lab., Deerfield, USA) wurde vor Gebrauch in 1% NaCl-Lösung bei 37°C für 2 Stunden eingelegt. Anschließend wurde sie dreimal in 37°C warmen Aqua dest. gewaschen und für eine weitere Woche in Aqua dest. eingelegt, wobei alle zwei Tage das Wasser erneuert wurde. Nachdem die Faser bei 37 °C getrocknet worden war, wurden 2 mg abgewogen in eine 10 ml Einmal-Spritze bis zur 2 ml Marke gepackt, ein Verschluß (Schlauch mit Klemme) angebracht und die fertige Säule autoklaviert.

Vor Gebrauch wurden die Säulen zweimal mit 10 ml RPMI 1640 überschichtet und bis zur 2 ml Marke durchgepresst. Dann wurde die Säule bei 37 °C für 45 min inkubiert, bevor 2 ml Zellsuspension (1×10^8 /ml) aufgetragen wurden. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Säule mit 20 ml RPMI gewaschen. Das Eluat enthielt die T-Zellfraktion, die auf ihre Reinheit mit Hilfe des Rosettentestes (Böhringer et al.1983) überprüft wurde. Das Auswaschen der B-Zellen erfolgte durch zweimaliges Ausdrücken der Watte in Medium. Die erhaltenen B- und T-Zellen sowie ungetrennte Blutlymphozyten wurden mit und ohne PWM (100 µl/10 ml) kultiviert und an Tag 6 mit ^3H -Tdr markiert

3.4.4. Kokultur

Nach Ficollseparierung wurden insgesamt 2.5×10^7 Zellen/10 ml Kulturmedium^{*} in Kulturflaschen gefüllt. In Kokulturen wurden

je $1,25 \times 10^7$ Zellen von den verschiedenen Tieren (KO; DYS) gemischt. Dazu wurden am Anfang ungetrennte Blutlymphozyten verwendet, später wurden ungetrennten Lymphozyten ($1,25 \times 10^7$) über Nylonwolle gewonnene T-Zellen ($1,25 \times 10^7$) zugegeben. Der ^3H -Tdr-Einbau wurde nach 6 Tagen Kultivierung gemessen.

3.4.5. Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf den ^3H -Tdr-Einbau in PWM-stimulierte Lymphozyten

$2,5 \times 10^7$ Zellen/10 ml Kulturmedium* wurden mit und ohne PWM (150 μl /10 ml) über 6 Tage kultiviert, wobei an Tag 3 entweder durch Austausch von 3 ml Medium oder durch Zugabe von 300 μl RPMI 1640 (10-fach konzentriert mit Zusätzen) gefüttert wurde. Am Tag 6 wurden die Zellen resuspendiert, zentrifugiert, gezählt, im entsprechenden Überstand resuspendiert und für 18 Stunden mit ^3H -Tdr markiert. Die Überstände waren folgend bezeichnet:

F-Med: frisches Kulturmedium*

aut.-Med: autologes Medium aus der 6-Tage Kultur

KO-Med: 6-Tage Medium eines Kontrolltieres

DYS-Med: 6-Tage Medium eines dysgamma globulinämischen Tieres

3.5. Purin- und Pteridinstoffwechsel

3.5.1. Purinbestimmung in Zellen und 6-Tage Überständen

Die isolierten Zellen (Ficoll-Methode) wurden zweimal in RPMI 1640 (ohne Serum) gewaschen und gezählt. Anschließend wurden 1×10^7 Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die verbleibenden Zellen in 1ml 5% Trichloressigsäure (Merck, Darm-

stadt) resuspendiert, für 10 Minuten in Eis gestellt und dann 10 Minuten bei $10\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit wassergesättigtem Diäthyläther fünfmal geschüttelt bis die Probe einen pH von 6,5 - 7 hatte und dann lyophilisiert (Lyophilisator Beta, Christ, Osterode a.Harz).

Überständen von 6-Tage Kulturen wurden Proben von 200 μ l entnommen, mit 10 μ l Perchlorsäure (1 mmol/l) versetzt und bei $10\,000 \times g$ zentrifugiert.

Der Purin- und Pyrimidingehalt der Proben wurde mit Hilfe der reversed-phase Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) identifiziert und quantifiziert. Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe (Modell 6000 A), einem Universal-Einspritzsystem (Modell U6K) und einem Detektor mit variabler Wellenlänge (Modell 450) der Firma Waters GmbH, Königstein/Ts. Die Säule (4x300mm) war mit einem reversed-phase Material (Spherisorb ODS II, 5 μ m, Bischoff, Leonberg) gefüllt. Das Elutionsmittel (0,01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 5,1) wurde vor dem Gebrauch durch einen Membranfilter (Typ HA, Porengröße 0,45 μ m, Millipore Corp. Bedford, USA) gefiltert. Die Flußrate war 1 ml pro Minute. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Die Identifizierung von Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure erfolgte mit Hilfe von Enzymreaktionen. Dazu wurden 50 μ l Probe mit 10 μ l des entsprechenden Enzyms (Guanase-EC 3.5.4.3., Xanthinoxidase-EC 1.2.3.2., Uricase-EC 1.7.3.3., alle Sigma, Taufkirchen) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mittels HPLC analysiert. Harnsäure wurde zusätzlich durch Mes-

sung bei 254 und 280 nm sowie durch Veränderung der Retentionszeit bei verschiedenen pH-Werten identifiziert. Uridin wurde durch Zugabe eines internen Standards bestimmt.

Die Quantifizierung erfolgte über den Vergleich der Peakflächen (Integrator Modell 3380 A, Hewlett-Packard, Avondale, USA) mit definierten Standardlösungen (Sigma, Taufkirchen).

3.5.2. Purinbestimmung im Plasma

2 ml heparinisiertes Hühnerblut wurden direkt nach Entnahme 20 min bei $800 \times g$ zentrifugiert und das Plasma anschließend abgenommen. Aliquots von 1 ml wurden tiefgefroren und vor Gebrauch mit Perchlorsäure (1 mol/l) zur Enteiweißung versetzt. Die Bestimmung der Purine erfolgte mit HPLC wie unter 3.5.1 beschrieben.

3.5.3. Purinstoffwechsel

3.5.3.1. Einfluß von Hypoxanthin auf die Stimulierung von Lymphozyten

Den isolierten Zellen wurde am Tag 0 $10 \mu g$ Hypoxanthin/ $2,5 \times 10^7$ Zellen/10 ml Medium zugegeben, um den Einfluß des salvage pathways auf die Stimulierung (PWM 150 μl /10 ml) und damit auf den 3H -Tdr-Einbau zu bestimmen. Weiterhin wurde am Tag 6 vor der Markierung nochmals Hypoxanthin in der gleichen Konzentration zugegeben, um den möglichen Einfluß dieses Metabolits während der Einbauphase zu untersuchen.

3.5.3.2. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin,
Hypoxanthin, Adenin und Glycin in PWM-
stimulierte Lymphozyten

Zur weiteren Überprüfung des Purinstoffwechsels wurden 6-Tage stimulierte Zellen (PWM 150 μ l/10 ml) sowohl mit

^3H -Thymidin (siehe 3.3.2.)

^3H -Hypoxanthin (spez. Aktivität 1-5 Ci/mmol)

^{14}C -Adenin (spez. Aktivität 50 mCi/mmol)

^{14}C -Glycin (spez. Aktivität 40 mCi/mmol)

(Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) markiert und für 8 Stunden inkubiert, um mögliche Unterschiede in Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Tieren zu untersuchen.

3.5.3.3. Stoffwechsel von Hypoxanthin in Lymphozyten

Lymphozyten wurden über Ficoll isoliert und anschließend dreimal in RPMI 1640 (ohne Zusätze) gewaschen und gezählt. 1×10^7 Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (400 x g), der Überstand verworfen und die Lymphozyten mit 10 μ l Hypoxanthin (1 mmol/l) und 100 μ l ^3H -Hypoxanthin (spez. Aktivität 40 mCi/mmol) in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (Umbreit et al. 1972; pH 7.4) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben 10 min bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen mit 10 μ l Standardgemisch bestehend aus: GMP (Guanosin-Monophosphat), IMP (Inosin-Monophosphat), AMP (Adenosin-Monophosphat), XMP (Xanthosin-Monophosphat), Inosin, Xanthosin, Adenosin, Guanin, Xanthin, Adenin, Harnsäure; alle 30 mg/100 ml und Hypoxanthin 10 mg/100

ml), versetzt und im Eis bis zur analytischen Trennung aufbewahrt.

Die Zellen wurden in 200 µl eiskaltem 0.9% NaCl aufgenommen, 10 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden sie erneut in 50 µl eiskaltem 0.9% NaCl resuspendiert und mit 10 µl Perchlorsäure (1 mol/l) gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10 000 x g wurde der Überstand abgenommen (Zellinhalt) mit 10 µl Standardgemisch versetzt und im Eis bis zur analytischen Trennung aufbewahrt.

Das nach der Perchlorsäurefällung verbleibende Pellet wurde in 100 µl 0.9% NaCl aufgenommen und in Zählfläschchen zur Bestimmung der Radioaktivität überführt.

Die Auftrennung der Purinmetabolite erfolgte mit Hilfe der HPLC, wobei die Peaks einzeln in Zählfläschchen gesammelt wurden. Die Zugabe der Standardmischung erfolgte zur besseren Identifizierung der einzelnen Peaks.

Zur Auftrennung der verschiedenen Peaks mußten neue Bedingungen für die HPLC an Hand von Standardsubstanzen erarbeitet werden. Besondere Schwierigkeiten bereiteten die sich sehr ähnlich verhaltenden Substanzen GMP/IMP, Hypoxanthin/Guanin und die hohen Retentionszeiten der Nucleoside. Erst die Erhöhung der theoretischen Bödenzahl durch Verwendung zweier hintereinander geschalteter Säulen bei gleichzeitiger Gradientenelution mit variierendem pH und Zugabe von Methanol erlaubte eine einwandfreie Trennung aller UV-aktiven Standardsubstanzen mit akzeptablen Retentionszeiten.

Reversed-phase-Säulen:

a) Spherisorb ODS II, 5 µm, 300x4mm

b) Radial Pak C₁₈ Kartusche, reversed phase 10 µ in

Kompressionskammer RCM 100; Waters GmbH, Königstein/

Ts.)

Elutionsmittel: I: 0.01 mol/l NH₄H₂PO₄ pH 4.8

II: 0.01 mol/l NH₄H₂PO₄ pH 3.6

III: 0.01 mol/l NH₄H₂PO₄ + 30% Methanol

Laufgeschwindigkeit 1 ml/min. Der Laufmittelwechsel erfolgte von I auf II nach 2 Minuten, der Übergang von II auf III 20 Minuten nach Start der Analyse.

3.5.4. Pteridinbestimmung (Stea et al.1980)

Die Auftrennung der Pteridine erfolgte mittels reversed-phase HPLC und ihre quantitative Messung mittels Fluoreszenzdetektion. Aus diesem Grund war es notwendig, die nicht fluoreszierenden Dihydro- und Tetrahydro-Derivate in die fluoreszierenden, oxidierten Formen überzuführen. Da diese Verbindungen lichtempfindlich sind, mußte die Reaktion bei Rotlicht durchgeführt werden. Außerdem mußten alle verwendeten Chemikalien suprapur sein (Merck, Darmstadt).

Die Probe (5×10^7 Zellen oder lyophilisierter Überstand einer 6-Tage Kultur, 10 ml) wurden mit 2 ml 0,1mol/l HCl aufgenommen (pH 1), mit einem Überschuß (150 - 200 µl) einer Jodlösung (0.5% I_2 und 1% KJ, Merck, Darmstadt) versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überschuß der Jodlösung wurde durch eine Tüpfelprobe mit einer Stärkelösung überprüft. Am Ende der Reaktion wurde das überschüssige Iod durch Zugabe einer 1% Ascorbinsäure zerstört (Stärketest). Durch diese Behandlung wurde gleichzeitig eine Ablösung der Pteridine von Proteinträgern erreicht, mit denen sie in vivo häufig assoziiert sind (Ziegler 1982b).

Zur Abtrennung hochmolekularer und anderer fluoreszierender Stoffe, die die HPLC-Bestimmung stören, wurde die oxidierte

Lösung auf eine mit dem Kationenaustauscher Dowex 50-X8 (H^+ , 200 mesh; Sigma, Heidelberg) 2 cm gefüllte Pasteurpipette gegeben, und das Eluat verworfen. Dann wurde die Säule mit 6 ml Aqua bidest. (Millipore Qualität) gewaschen und das Eluat I aufgefangen. Danach wurden 6 ml 1mol/l NH_4OH über die Säule gegeben und alle im Kationenaustauscher festgehaltenen Pteridine als Eluat II aufgefangen. Eluat I und II wurden im weiteren Analysengang unterschiedlich behandelt.

Eluat I, welches Isoxanthopterin und die Lumazine enthalten kann, wurde direkt auf eine Dowex 1-X8 Säule (OH^- , 200 mesh, Sigma, Heidelberg) gegeben, mit 6 ml NH_4OH (pH 9) und dann 0,5 ml Aqua bidest. gewaschen. Beide Eluate wurden lyophilisiert und im Dunkeln bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

Eluat II wurde mit Eisessig neutralisiert, dann gefriergetrocknet und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

Die lyophilisierten Proben wurden in 100 μl Aqua bidest. gelöst und mit Hilfe der HPLC (alles Beckman, München) analysiert
Pumpe (110A)

Injektor, Altex 100P, 20 μl

Fluorometer Shimadzu, Typ RF 530, 350nm Exzitation; 450nm Emission

Integrator, Shimadzu C-R1B

Säule, Ultrasphere-ODS C18, 250x4,6 mm, 5 μm

Zur Bestimmung wurden zwei verschiedene Laufmittel verwendet:

a. 10% Methanol

b. H_3PO_4 (3mmol/l)/7% Methanol/1% Acetonitril (pH 2.3)

Die qualitative Identifizierung der Peaks erfolgte durch 2 verschiedene Laufmittel und die Aufaddierung von Standardsubstanzen. Die quantitative Bestimmung der Pteridine erfolgte mittels externer Standards und Eichkurven. Die Standardpteridine stammen von Dr.Schircks Laboratory, Jona, Schweiz.

3.6. Untersuchungen zur Xanthindehydrogenase

3.6.1. Bildung von Harnsäure in zerstörten und lebenden aviären Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden wie unter 3.2.3. gewonnen, jedoch enthielt das Medium keine Zusätze. Anschließend wurden die Zellen unterschiedlich behandelt:

- a. 1×10^8 Zellen wurden in 500 μ l eiskaltem (1 Stunde mit Sauerstoff begastem oder unbegastem) Tris-HCl-Puffer (7.571 g/500 ml, pH 8) resuspendiert und 30 Sekunden beschallt
- b. 1×10^8 Zellen wurden wie unter a aufgenommen und resuspendiert, anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und aufgetaut
- c. 1×10^8 Zellen wurden wie unter a resuspendiert und anschließend nicht weiter behandelt (intakte Zellen)

Zu den zerstörten und intakten Zellen wurde 500 μ l Xanthinlösung (100 μ mol/l) gegeben, das Gemisch in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeiten 100 μ l Proben entnommen. Diese Proben wurden mit 50 μ l Perchlorsäure (1 mol/l) versetzt, zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge) und mit Hilfe der HPLC auf entstandene Harnsäure untersucht. (Bedingungen wie in 3.5.1., Elutionsmittel aber 0.1 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 5.1).

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden verschiedene Proben mit Humanserumalbumin (1 mg/ml), NAD (0.5 mmol/l) oder Mercaptoethanol (10^{-4} mol/l) versetzt.

Außerdem wurde die Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung in lebenden Lymphozyten mit den beiden Xanthinkonzentrationen 50 μ mol/l und 500 μ mol/l untersucht.

3.6.2. Harnsäurebildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

5×10^6 – 3×10^7 intakte Lymphozyten/100 μ l begastem Tris-HCl-Puffer pH 8 wurden mit 200 μ mol/l Xanthin im Wasserbad bei 37 °C für 1.5 Stunden inkubiert, die Reaktion mit 10 μ l Perchlorsäure gestoppt und die gebildete Harnsäuremenge über HPLC bestimmt.

3.6.3. Bestimmung der apparenten kinetischen Größen K'_m , V'_{max}

1×10^7 Zellen /100 μ l begastem Tris-HCl-Puffer, pH .8, wurden mit steigenden Xanthinkonzentrationen (50 – 500 μ mol/l) für 1.5 Stunden inkubiert, dann mit 10 μ l Perchlorsäure gestoppt. Die Michaelis-Konstante K_m und die Maximalgeschwindigkeit V_{max} wurde aus der Steigung verschiedener linearisierter Darstellungen der Michaelis-Menten-Gleichung durch Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet. Bei der Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Initialgeschwindigkeit (S/v) gegen die Substratkonzentration (S) resultiert eine Gerade, deren Steigung dem reziproken Wert der V_{max} entspricht, während im Diagramm v gegen v/S die negative Steigung zahlenmäßig die Michaeliskonstante darstellt (Fromm 1975).

3.6.4. Harnsäurebildung in aviären Lymphozyten nach Trypsinierung

1×10^8 Zellen wurden mit 0.25% Trypsin (EC 3.4.21.4., Sigma, Taufkirchen) für 1 Stunde inkubiert, anschließend zentrifugiert und mit 100 μ l Trypsinblocker (Aprotinin, Sigma, Taufkirchen)

versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau auf Überlebensfähigkeit untersucht. 5×10^7 Zellen wurden mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Xanthinlösung versetzt und im Wasserbad inkubiert. Die zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben wurden mit Perchlorsäure gestoppt, zentrifugiert und die Harnsäure bestimmt.

3.6.5. Harnsäurebildung in lebenden aviären Lymphozyten bei pH 7.4

Um die Harnsäurebildung unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen wurden 1×10^7 Zellen/100 μl RPMI 1640 (ohne Zusätze) mit 200 μmol Xanthin/l für 5 Stunden inkubiert und zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen. Bei den ermittelten Harnsäurewerten wurde die im RPMI enthaltene Harnsäuremenge abgezogen.

3.7. Statistische Analyse

Aus den Einzelwerten einer Gruppe wurde das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) mit seinem Standardfehler (SD) errechnet. Die Prüfung auf die Unterschiedlichkeit zweier unabhängiger Meßreihen wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit < 0.05 galten als signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Zellgewinnung und Kultivierung

Für die nachfolgenden Untersuchungen zur Charakterisierung einer aviären Dysgammaglobulinämie mußte zuerst ein funktionierendes in vitro System erstellt werden. Dazu wurden verschiedene Variablen, wie unterschiedliche Lymphozytenisolationstechniken, Kulturbedingungen, Zelldichte, Mediumzusätze, Notwendigkeit von Serum oder anderer Zusätze untersucht. Als Meßgrößen dienten Zellzahl, Überlebensfähigkeit der Zellen, DNA-Synthese (Einbau von ^3H -Tdr) und Stimulationsindices 6-Tage kultivierter Lymphozyten. Das Tiermaterial beschränkte sich bei diesen Untersuchungen auf Kontrolltiere, da wegen der geringen Fertilität und Schlupfraten, die Anzahl der vorhandenen dysgammaglobulinämischen Tiere gering war.

4.1.1. Lymphozytengewinnung

Bei der Gewinnung aviärer, peripherer Blutlymphozyten wurde aus folgenden Gründen im weiteren Verlauf der Arbeit die Ficoll-Trennmethode im Gegensatz zur Langsamzentrifugation verwendet:

- a) Die Ausbeute lebensfähiger Zellen (Trypanfärbung) am Tag der Isolierung (Tag 0) aus der gleichen Ausgangsmenge Blut (5 ml) war signifikant höher (Tab.2).
- b) Die Überlebensrate nach 6-tägiger Kultivierung mit und ohne Mitogen (PWM 10 $\mu\text{l/ml}$) war nach beiden Isolierungsmethoden annähernd gleich (Tab.2).

c) Der ^3H -Tdr-Einbau (cpm) und die Stimulationsindices (Si) der über Ficoll gewonnenen Lymphozyten lagen signifikant höher (Tab.2).

Durch zusätzliche Änderung der Temperatur während des Zentrifugierens von 4°C auf 18°C konnte die Ausbeute lebender Zellen an Tag 0 auf circa 95% erhöht werden. Es ist noch hinzuzufügen, daß die Lymphozytenfraktion nach beiden Methoden manchmal geringe Mengen (1-2%) von Erythrozyten enthielt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit 10% FCS, ohne Fütterung an Tag 3, in Kulturflaschen.

4.1.2. Zellkultivierung

4.1.2.1. Kultivierung von aviären Kontrolllymphozyten in Petrischalen, Röhrchen oder Kulturflaschen

Bei der 6-Tage Kultivierung von 2.5×10^7 Zellen/10 ml Kulturmedium* (mit 10% FCS) erwiesen sich Falconflaschen im Vergleich zu Petrischalen und Plastikröhrchen sowohl bezüglich der Zellausbeute an Tag 6 (Tab.3) als auch der Stimulationsindices (Tab.3) am geeignetsten.

4.1.2.2. Partieller Mediumaustausch an Tag 3 (Füttern)

Fütterung am dritten Tag der Kultivierung (vorsichtige Entnahme von 3 ml Medium aus den Flaschen und Zugabe von 3 ml neuem Kulturmedium*) ergab nach 6 Tagen bis zur doppelten Zellanzahl ($p < 0.05$) und zusätzlich signifikant höhere ^3H -Tdr-Einbauten

Tab.2 : Einfluß der Lymphozytengewinnung auf die Zellzahl an Tag 0 und Tag 6 und auf den Einbau von ^3H -Tdr (cpm) nach Stimulierung mit PWM (10 $\mu\text{l/ml}$)

	Lymphozytengewinnung		Signifikanz
	Langsamz.	Ficoll	
Zellzahl Tag 0 (n=12)	6.34 ± 2.60 $\times 10^7$	2.86 ± 1.30 $\times 10^8$	s.
Zellzahl Tag 6 ohne PWM (n=11)	0.74 ± 0.12 $\times 10^6$	0.73 ± 0.12 $\times 10^6$	n.s.
Zellzahl Tag 6 + PWM (n=11)	9.22 ± 5.39 $\times 10^6$	6.38 ± 4.33 $\times 10^6$	n.s.
cpm (ohne PWM) (n=11)	517 ± 264	1141 ± 644	s.
cpm (+ PWM) (n=11)	1282 ± 644	4837 ± 2029	s.
Stimulationsindex (n=11)	2.62 ± 1.07	5.15 ± 3.10	s.

s. =signifikant ($p < 0.05$)

n.s. = nicht signifikant

Tab.3 : Zellzahl und Stimulationsindex (Si) nach 6-tägiger Kultivierung von Hühnerlymphozyten mit (10 µl/ml) und ohne PWM in verschiedenen Kulturgefäßen

Kulturgefäß	Zellzahl ($\times 10^6$) ohne PWM	Zellzahl ($\times 10^6$) mit PWM	Si
Petrischalen (n=7)	0.93 ^a $\pm$ 0.28	2.39 ^a $\pm$ 0.54	2.17 ^a $\pm$ 0.40
Röhrchen (n=7)	0.60 ^b $\pm$ 0.18	1.52 ^b $\pm$ 0.23	1.19 ^b $\pm$ 0.39
Flaschen (n=7)	1.44 ^c $\pm$ 0.40	4.30 ^c $\pm$ 0.80	4.93 ^c $\pm$ 0.76

a, b, c, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab.4 : Zellzahl an Tag 6 und ³H-Tdr-Einbau (cpm) in Lymphozyten von Kontrollhühnern, mit und ohne Fütterung der Zellkultur an Tag 3 ($\pm$ 10 µl PWM/ ml; 10 % FCS)

	ohne Füttern		mit Füttern	
	0 PWM	+PWM	0 PWM	+PWM
Zellzahl ($\times 10^6$) (n=8)	0.78 ^a $\pm$ 0.20	2.7 ^b $\pm$ 1.31	0.76 ^a $\pm$ 0.15	5.09 ^c $\pm$ 2.54
cpm (n=8)	463 ^a $\pm$ 116	2153 ^b $\pm$ 412	561 ^a $\pm$ 103	4698 ^c $\pm$ 585

a,b,c, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

(Tab.4). Im weiteren Versuchsablauf wurden die Kulturen deshalb an Tag 3, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, gefüttert.

4.1.2.3. Verschiedene Zellkonzentrationen an Tag 0

Als nächstes wurde der Einfluß der Zellzahl an Tag 0 auf die Stimulierbarkeit (PWM 10 μ l/ml) von Kontrolllymphozyten untersucht. In einem konstanten Kulturvolumen von 10 ml wurden Zellzahlen von 5×10^6 bis 5×10^7 ausgetestet. Ohne PWM zeigten sich keine deutlichen Unterschiede im ^3H -Tdr-Einbau in Abhängigkeit von der Zellzahl. Bei Mitogenzugabe nahm die Lymphozyten DNA-Synthese mit steigender Zellzahl (5×10^6 - 2.5×10^7) zu. Zu hohe Zelldichte ($5 \times 10^7/10$ ml) hatte eine Verminderung des Thymidineinbaues zur Folge (Abb.1; Tab.5). Die weiteren Versuche wurden mit einer Zelldichte von $2.5 \times 10^7/10$ ml durchgeführt.

4.1.2.4. Wirkung verschiedener Mediumzusätze

Über die Notwendigkeit des Zusatzes von Serum oder anderen Stoffen zum Kulturmedium von Säugerlymphozyten gibt es unterschiedliche Aussagen. Es wurden sowohl die Notwendigkeit von Serum (Yachnin and Raymond 1975) als auch serumfreie Kulturen (Mattson and Lindahl-Kiessling 1971) bis zur Supprimierung der mitogenen Antwort bei FCS-Zugabe (Opitz et al.1977) beschrieben. Auch bei den wenigen Arbeiten über Kultivierungsuntersuchungen aviärer Lymphozyten wurden Kulturen mit und ohne Serumzusätze verwendet (Lee 1974, Kirchner and Oppenheim

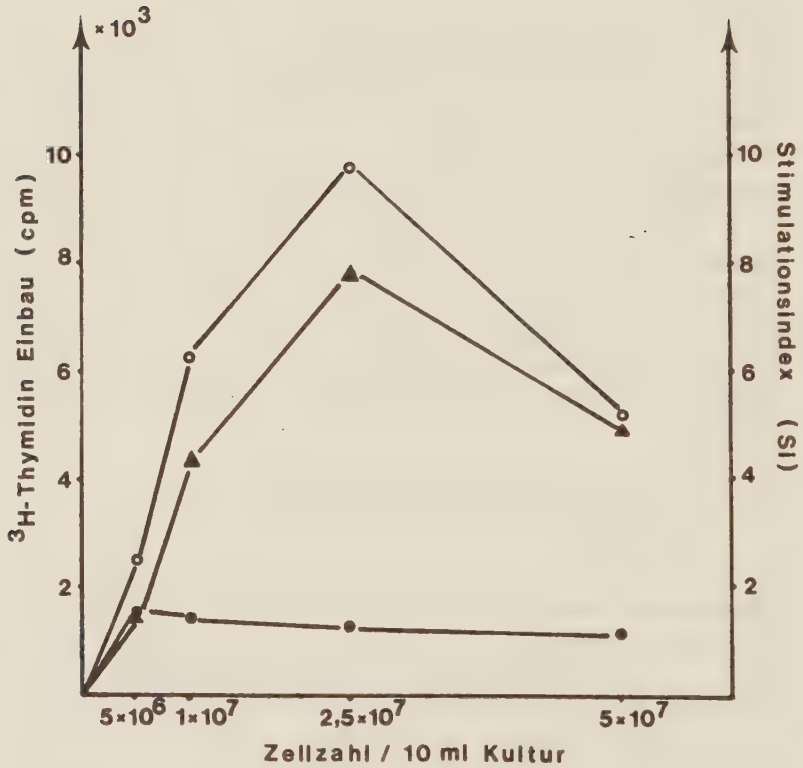


Abb.1 : ^3H -Thymidineinbau (cpm) und Stimationsindex (SI) in Abhängigkeit von der Zellzahl an Tag 0

- ^3H Tdr Einbau (ohne PWM)
- ^3H -Tdr Einbau (PWM $10 \mu\text{l/ml}$)
- ▲— Stimationsindex

Tab.5 : Einfluß der Zellzahl an Tag 0 auf den ^3H -Tdr-Einbau (cpm) und die Stimulationsindices (Si) von KO-Lymphozyten nach PWM-Zugabe (10 $\mu\text{l/ml}$)

	Zellzahl an Tag 0			
	5×10^6	1×10^7	2.5×10^7	5×10^7
cpm (ohne PWM)	1543 ^a	1433 ^a	1288 ^a	1150 ^a
(n=12)	± 466	± 445	± 468	± 730
cpm (+PWM)	2524 ^a	6274 ^a	9796 ^a	5209 ^a
(n=12)	± 2380	± 4453	± 6827	± 3520
Si	1.57 ^a	4.29 ^b	7.72 ^c	4.91 ^{bc}
(n=12)	± 1.25	± 2.47	± 4.52	± 2.19

a, b, c, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

1972, Hovi et al.1978). Bei den serumfreien Ansätzen handelt es sich um Kulturen, die nicht länger als 72 Stunden inkubiert wurden (Kirchner and Oppenheim 1972; Hovi et al.1978; Benedict et al.1980). Kulturen bis zu 7 Tagen enhielten in der Regel Serum (meist FCS) im Medium (Chanh et al.1980; Pink and Vainio 1983).

Um für die folgenden Arbeiten die günstigsten Kulturbedingungen zu erreichen, wurden verschiedene Seren und andere Zusätze zum Medium gegeben und ihr Einfluß auf die Überlebensrate nach 6-tägiger Kultivierung und den ^3H -Tdr-Einbau nach PWM-Stimulation (10 $\mu\text{l/ml}$) von KO-Lymphozyten ermittelt.

4.1.2.4.1. Wirkung von foetalem Kälberserum (FCS) auf die Stimulierung mit PWM von KO-Lymphozyten

Die von anderen Autoren bei verschiedenen FCS-Chargen gefundene supprimierende Wirkung des Serums auf die mitogene Antwort von Mäuselymphozyten (Opitz et al.1977) wurde während diesen Arbeiten nicht beobachtet. Bezüglich der Überlebensrate der Zellen an Tag 6 hatte die steigende FCS-Konzentration (0-10%) auf Kulturen ohne Mitogen keinen Einfluß, während PWM-stimulierte Proben (10 $\mu\text{l/ml}$) mit steigender Serumkonzentration auch zunehmende Zellzahlen aufwiesen (Abb.2; Tab.6). Abb.2 zeigt die Antwort der KO-Lymphozyten nach PWM-Stimulierung in Abhängigkeit von der an Tag 0 zugesetzten Serumkonzentration. Die Lymphozytenantwort auf PWM war eindeutig von der Zugabe von Serum abhängig (Tab.7). Mit zunehmender FCS-Konzentration stieg der Stimulationsindex linear mit der Gleichung

$$y = 0.92x - 1.78$$

$$(r = 0.898)$$

an.

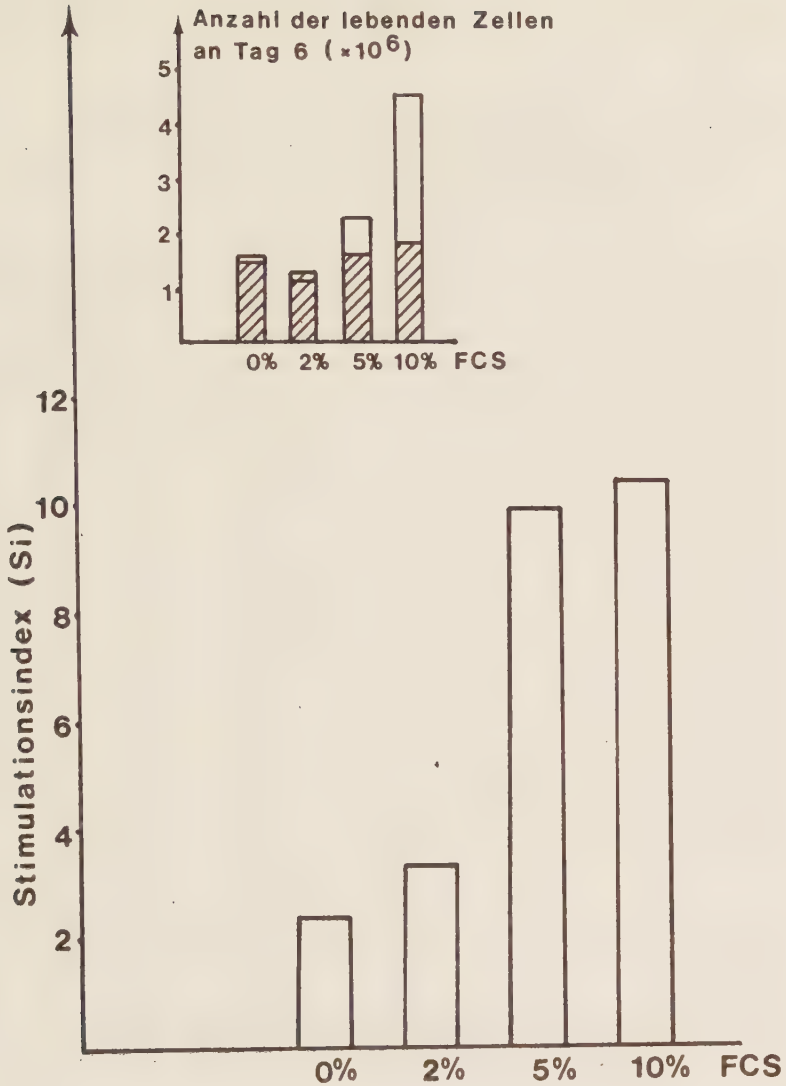


Abb.2 : Wirkung steigender Konzentrationen von fötalem Kälberserum (FCS) auf die Stimulierung mit PWM ($10\mu\text{l}/\text{ml}$) und die Anzahl überlebender Lymphozyten von Kontrollhühnern

 ohne PWM
 mit PWM

Tab.6 : Anzahl lebender Lymphozyten von Kontrollhühnern mit (10 µl/ml) und ohne PWM nach 6-tägiger Kultivierung mit verschiedenen Seren im Kulturmedium

Versuch	Serumkonz. (%)	Zellzahl Tag 6 ($\times 10^6$)	
		0 PWM	10 µl PWM/ml
verschiedene FCS- konzentrationen	0 (n=14)	1.52 $\pm$ 1.20	1.62 $\pm$ 1.11
	2 (n=14)	1.26 $\pm$ 1.06	1.15 $\pm$ 0.53
	5 (n=14)	1.62 $\pm$ 1,37	2.28 $\pm$ 1.11
	10 (n=14)	1.82 $\pm$ 1.79	4.50 $\pm$ 2.79
verschiedene HS- konzentrationen	0 (n=16)	1.19 $\pm$ 0.71	2.91 $\pm$ 2.43
	1 (n=8)	0.29 $\pm$ 0.19	4.24 $\pm$ 4.12
	2 (n=16)	0.31 $\pm$ 0.14	4.11 $\pm$ 3.59
	5 (n=16)	0.44 $\pm$ 0.22	4.69 $\pm$ 3.64
	10 (n=8)	0.60 $\pm$ 0.29	4.49 $\pm$ 2.18
Vergleich HS mit FCS	0 (n=16)	2.17 $\pm$ 1.38	2.47 $\pm$ 1.18
	2 HS (n=16)	0.51 $\pm$ 0.30	2.87 $\pm$ 2.88
	5 FCS (n=16)	0.93 $\pm$ 0.62	3.27 $\pm$ 2.07
	10 FCS (n=16)	1.10 $\pm$ 0.81	4.18 $\pm$ 2.39
Vergleich HS D-HS, A-HS	2 HS (n=19)	1.25 $\pm$ 1.04	3.49 $\pm$ 2.71
	2 D-HS (n=15)	1.52 $\pm$ 1.03	2.65 $\pm$ 2.07
	2 A-HS (n=19)	1.14 $\pm$ 0.85	4.19 $\pm$ 3.13

Tab.7 : Stimulationsindex (Si) nach PWM-Stimulation
(10 μ l/ml) von KO-Lymphozyten in Abhängigkeit
von der FCS-Konzentration im Kulturmedium

Tier Nr.	FCS-Konzentration (%)			
	0	2	5	10
1	0.58	4.73	16.6	10.98
2	0.95	4.02	12.44	12.02
3	0.72	0.62	1.74	25.0
4	3.32	2.59	4.67	4.39
5	1.98	1.91	14.68	20.51
6	5.43	5.25	11.79	12.26
7	1.76	12.46	10.60	10.99
8	1.16	1.89	2.43	3.56
9	3.98	3.21	3.98	4.24
10	2.11	2.67	22.75	4.25
11	1.18	2.14	26.46	15.79
12	7.51	1.78	4.43	14.45
13	2.03	1.15	3.73	5.09
14	1.23	2.67	2.85	2.98
$\bar{x}$	2.42 a	3.36 a	9.94 b	10.46 b
$\pm$ SD	2.00	2.92	7.94	6.85

a,b signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

4.1.2.4.2. Wirkung von normalem Hühnerserum (HS) auf die Stimulierung mit PWM von KO-Lymphozyten

Um die manchmal hohen Einbauraten des Nullwertes (Kulturen ohne Mitogen) bei FCS-Zugabe zu vermindern und damit eindeutige Stimulationsindices zu erhalten, wählten wir als neuen Mediumzusatz inaktiviertes Hühnerserum von Kontrolltieren (HS). Die Kulturen wurden mit verschiedenen Serumkonzentrationen (0-10%) über 6-Tage kultiviert, an Tag 3 mit Kulturmedium plus adequater Serummenge gefüttert und an Tag 6 im entsprechenden Medium markiert. Die Anzahl der lebenden Zellen an Tag 6 zeigte mit und ohne PWM keine signifikante Abhängigkeit von der Serumkonzentration, wobei die Kulturen mit Mitogen deutlich mehr Zellen enthielten als die Kulturen ohne Mitogen (Abb.3; Tab.6). Als optimale Serumkonzentration erwies sich 2% HS; mit steigender Konzentration (10%) verminderte sich die Stimulierbarkeit von KO-Lymphozyten signifikant (Abb.3; Tab.8).

4.1.2.4.3. Vergleichende Untersuchung zur Wirkung von HS und FCS auf die Stimulierbarkeit von KO-Lymphozyten

Um Tier- und versuchsabhängige Schwankungen auszuschalten, wurden Kulturen parallel mit HS (2%) oder FCS (5%, 10%) kultiviert. Bezüglich der lebenden Zellen an Tag 6 bestätigten sich die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen (Abb.4; Tab.6). Mit und ohne Mitogen zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit von der Serumkonzentration; Kulturen mit Mitogen

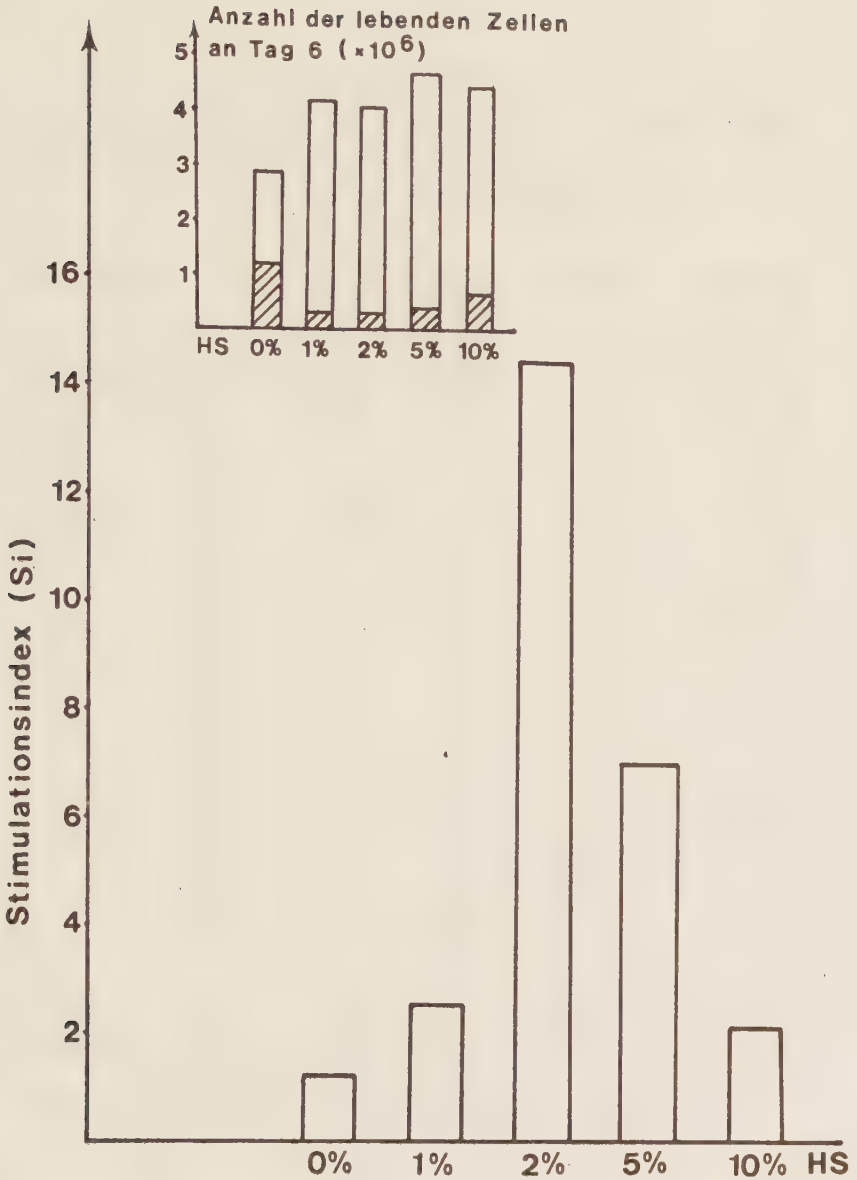


Abb.3 : Wirkung steigender Hühnerserum (HS)-Konzentrationen auf die Stimulierung mit PWM (10 μ l/ml) und die Anzahl überlebender Lymphozyten von Kontrollhühnern

 ohne PWM
 mit PWM

Tab.8 : Stimulationsindex (Si) nach PWM-Stimulation (10 μ l/ml)
von KO-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Hühnerse-
rumkonzentration im Kulturmedium

Tier Nr.	HS-Konzentration (%)				
	0	1	2	5	10
1	0.11		4.28	1.10	2.00
2	0.92		3.45	1.91	1.30
3	1.10		3.97	2.50	1.55
4	1.17		22.60	4.27	2.12
5	4.10		35.46	11.89	6.56
6	0.87		9.72	2.03	1.32
7	0.92		19.84	4.80	1.46
8	0.54		3.94	2.13	0.57
9	0.16	1.59	7.89	1.07	
10	0.84	1.13	1.40	8.30	
11	1.09	1.35	2.49	1.61	
12	3.69	2.67	1.52	20.70	
13	0.13	0.60	17.10	16.90	
14	1.06	5.44	23.70	6.94	
15	1.15	1.73	24.76	8.23	
16	1.20	5.62	48.70	16.70	
$\bar{x}$	1.19 ^a	2.52 ^{bc}	14.43 ^d	6.94 ^{bd}	2.11 ^{ac}
$\pm$ SD	1.12	1.95	13.90	6.39	1.86

a, b, c, d, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

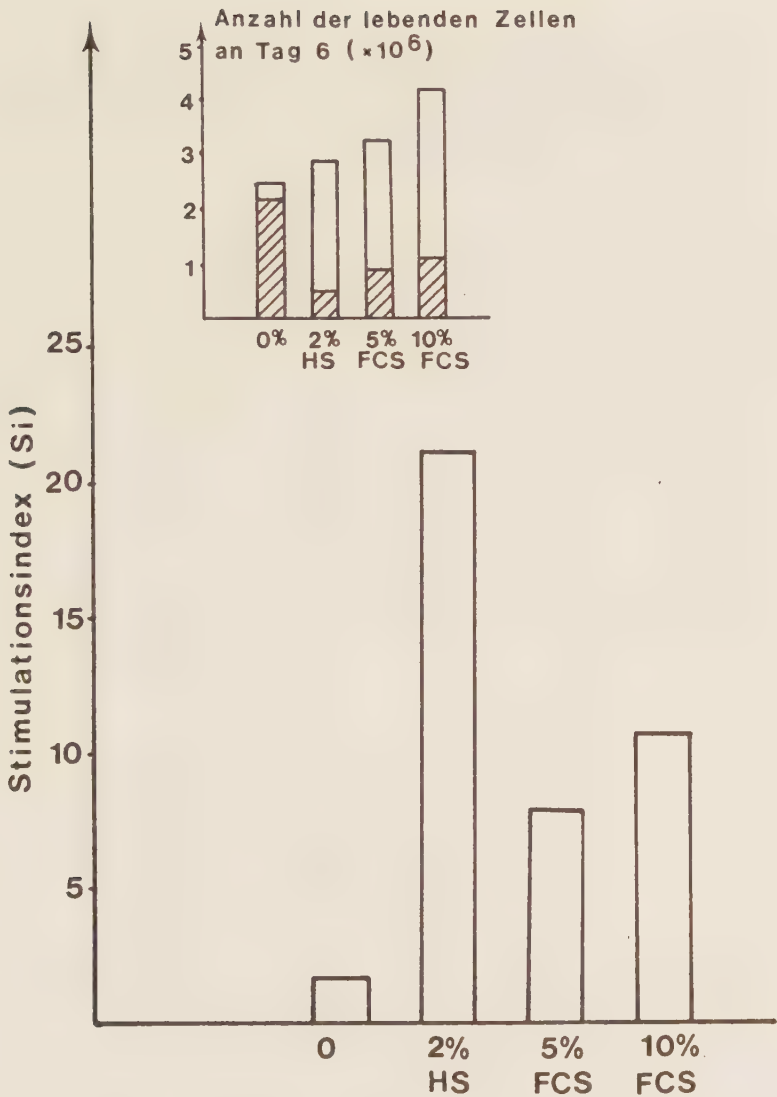


Abb.4 : Wirkung von Hühnerserum (HS) und fötalem Kälberserum (FCS) auf die Stimulierung mit PWM (10 μ l/ml) und die Anzahl überlebender Lymphozyten von Kontrollhühnern

 ohne PWM
 mit PWM

Tab.9 : Vergleich der Stimulationsindices (Si) nach PWM-Stimulierung (10 μ l/ml) von KO-Lymphozyten nach Zugabe von Hühnerserum (HS) oder fötalem Kälberserum (FCS) zum Kulturmedium

Tier Nr.	Si bei verschiedenen Serumkonzentrationen (%)			
	0	2 HS	5 FCS	10 FCS
1	0.55	15.63	4.91	6.41
2	2.32	37.98	27.04	11.93
3	0.63	41.12	4.17	16.06
4	1.08	40.80	8.82	17.85
5	2.60	11.20	24.35	24.63
6	4.28	16.37	1.49	1.73
7	1.08	20.96	4.21	4.93
8	1.88	6.54	3.23	6.46
9	2.31	38.80	4.27	22.18
10	2.01	4.17	6.80	1.87
11	1.28	21.79	3.13	5.21
12	1.65	12.56	5.50	11.42
13	2.77	13.38	6.10	12.67
14	1.03	3.34	2.04	2.19
15	0.40	12.61	9.30	10.84
16	2.08	40.80	8.07	14.46
$\bar{x}$	1.75 ^a	21.13 ^b	7.71 ^c	10.68 ^c
$\pm$ SD	1.00	14.01	7.38	7.10

a, b, c, signifikant unterschiedlich
($p < 0.05$)

enthielten immer mehr überlebende Zellen als Ansätze ohne Mitogen. Bei vergleichender Betrachtung der Stimulationsindices ergab sich, daß mit 2% HS signifikant höhere Stimulationswerte erreicht wurden als mit 5 oder 10% FCS (Abb.4; Tab.9). Ohne Serum konnte wiederum keine Stimulation nachgewiesen werden.

4.1.2.4.4. Wirkung verschiedener Hühnerseren als Mediumzusätze auf die PWM-Stimulation von KO-Lymphozyten

Die günstigen Ergebnisse mit homologem Serum (verschiedene Serumpools gesunder Kontrollhühner, HS) als Zusatz zum Medium ließ die vergleichende Untersuchung von HS, Serum dysgammaglobulinämischer Hühner (D-HS) und Serum agammaglobulinämischer Hühner (A-HS) interessant erscheinen. Außerdem bietet die Verwendung von A-HS die Möglichkeit in späteren Projekten die Immunglobulinsynthese während der in vitro Kultivierung zu messen. In Tab.10 sind die mittleren Serum-Ig-Konzentrationen solcher Seren aufgeführt

Tab.10: Mittlere Serum-Ig-Konzentrationen (mg/ml)

	HS	D-HS	A-HS
IgG	10.0	0.01	0.0005 ¹⁾
IgM	1.5	6.0	0.0025 ¹⁾
IgA	0.4	2.0	0.0010 ¹⁾

1) In der einfachen radialen Immundiffusion nicht mehr erfaßbar

Es zeigte sich auch unter diesen Bedingungen, daß die Zellzahl an Tag 6 keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Seren aufwies (Abb.5; Tab.6). Die getesteten Tiere (n=15-19) zeigten individuell verschieden starke Antworten auf PWM (10 μ l/ml), aber die meisten (n=13) zeigten maximale Stimulation mit 2% A-HS (Tab.11). Während die Zugabe von HS und D-HS keinen signifikanten Unterschied in der Stimulierbarkeit mit PWM erzielte, lagen die Werte mit A-HS signifikant höher (Abb. 5; Tab.11). Hühnerserum beeinflußt somit den mitogenen Effekt abhängig vom Immunglobulingehalt. Im Mäusesystem (Coutinho et al. 1973) wurde nachgewiesen, daß serumhaltige Kulturen höhere Mitogenkonzentrationen benötigen, um die adequate Stimulationswerte von serumfreien Kulturen zu erzielen. Somit scheinen auch im Hühnersystem Mitogen und Immunglobuline um die Rezeptoren auf der Lymphozytenoberfläche zu konkurrieren.

4.1.2.4.5. Pufferung des Kulturmediums mit Hepes-Puffer

Die zusätzliche Pufferung von RPMI 1640* mit 1 molarem Hepes-Puffer (pH 7.2-7.4) führte nicht zu besseren Stimulationsergebnissen als die alleinige Zugabe von 2g NaHCO_3 /l.

4.1.2.4.6. Wirkung von 2-Mercaptoethanol (2-ME) auf die PWM-Stimulierung von KO-Lymphozyten

Über die Wirkung von 2-ME als Mediumzusatz gibt es zahlreiche Veröffentlichungen. Seine Wirkung reicht vom essentiellen Faktor für die Etablierung und Vermehrung vieler Mäuselymphom-Zell-

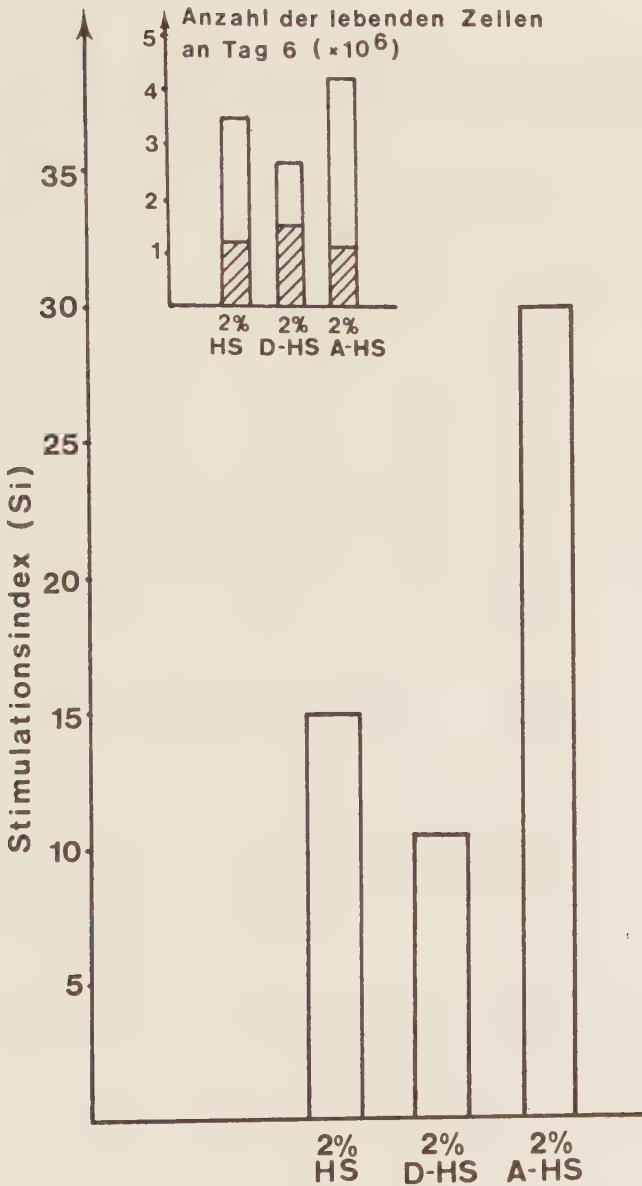


Abb.5 : Wirkung von verschiedenen Hühnerseren (Hühnerserum, HS; Serum von DYS-Hühnern, D-HS; Serum agammaglobulinämischer Hühner, A-HS) auf die Stimulierung mit PWM (10 μ l/ml) und die Anzahl überlebender Lymphozyten von Kontrollhühnern

 ohne PWM

Tab.11 : Stimulationsindices (Si) nach 6-tägiger PWM-Stimulation
(10 μ l/ml) mit verschiedenen Hühnerseren im Kulturmedium

Tier Nr.	Serumkonz. (%)		
	2 HS	2 D-HS	2 A-HS
1	13.08	8.56	72.03
2	13.09	11.30	43.09
3	14.36	3.41	22.45
4	12.97	19.08	43.35
5	3.98	3.30	9.00
6	10.75	13.19	76.57
7	34.58	25.40	80.81
8	17.36	45.69	16.31
9	23.05	4.92	18.21
10	4.60	0.63	5.97
11	6.67	1.34	1.37
12	13.03	3.91	12.91
13	14.49	-	26.95
14	11.82	-	6.13
15	3.14	-	11.79
16	14.62	-	28.39
17	17.17	1.43	23.82
18	33.42	13.76	62.70
19	25.86	1.54	10.20
$\bar{x}$	15.16 ^a	10.50 ^a	30.11 ^b
$\pm$ SD	8.82	12.18	25.59

a,b signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

inien, über die Erhöhung der primären Immunantwort in vitro bis zur Fähigkeit, Makrophagen funktionell in der primären Immunantwort zu ersetzen (Goodman and Weigle 1977). Als mögliche Wirkungsweise wurde die Aktivierung einer Serumkomponente (Opitz et al. 1977), Verbesserung der Zell-Zell-Interaktion durch unspezifische Bindung an die Lymphozytenoberfläche, direkte intrazelluläre Wirkung (Goodman and Weigle 1977) oder der Oxidationsschutz für das Gluthation (Hoffeld and Oppenheim 1980) vermutet.

Zugabe von 2-ME (5×10^{-5} mmol/l) zum Kulturmedium* (+ 2% HS) an Tag 0 oder Tag 0 und Tag 3 (Füttern) ergab keinen Einfluß auf die Zellrate an Tag 6 (Tab.12), aber die Stimulationsindices stiegen für jedes Tier an. Die Verbesserung bei 2-ME-Zugabe war wegen der hohen Standardabweichung zwischen den Einzeltieren nicht signifikant (Tab.12). Aber wegen des beobachteten positiven Einflusses wurde im weiteren Versuchsablauf 2-ME dem Kulturmedium zugeben (Tag 0 und Tag 3).

4.1.2.4.7. Wirkung von Ovalbumin, Glucose und Thyroxin als Mediumadditive

Versuche zur serumfreien Kultivierung von aviären Blutlymphozyten über 6 Tage mit verschiedenen Ovalbuminkonzentrationen (0.02 mg/ml - 0.1 mg/ml) zeigten keine Stimulation mit PWM (10 µl/ml), obwohl nach 6 Tagen genügend lebende Zellen in den Kulturen waren (Tab.13).

Auf die Besonderheiten des Hühnerblutes eingehend (erhöhter Glucosespiegel und das Fehlen eines Thyroxin-bindenden Prote-

Tab.12 : Zellzahl ($\bar{x} \pm SD$) und Stimulationsindex (Si) von
KÖ-Lymphozyten (n=9) nach 2-ME-Zugabe

		2-ME (5×10^{-5} mmol/l)		
		0	2-ME	2-ME
		Tag 0	Tag 0	Tag 0 + 3
Zellzahl ($\times 10^6$)	ohne PWM	0.92 ^a $\pm$ 0.50	0.59 ^a $\pm$ 0.24	0.55 ^a $\pm$ 0.27
	mit PWM (10 μ l/ml)	5.07 ^b $\pm$ 3.53	3.84 ^b $\pm$ 2.61	3.28 ^b $\pm$ 1.38
Stimulationsindex (Si)		16.00	19.07	20.95
		4.13	8.06	8.00
		4.05	8.67	10.20
		11.10	19.00	14.52
		6.46	11.26	45.22
		6.95	26.86	40.22
		4.29	6.21	3.27
		3.56	2.06	6.21
		7.90	9.08	11.29
$\bar{x}$		7.16 ^a	12.25 ^a	17.76 ^a
$\pm SD$		4.10	7.80	15.06

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

ins) wählten wir Glucose (1mg und 0.5 mg/ml) und Thyroxin (1.2×10^{-4} und 6×10^{-4} mg/ml) als Serumersatz.

Hühnerblut enthält zwischen 2-3 mg Glucose/ml Blut; RPMI 1640 Medium hat einen Glucosegehalt von 2mg/ml. Durch Zugabe der Glucoselösung wurden Endkonzentrationen von 2.5 und 3 mg Glucose/ml Kulturmedium* erreicht. Im Gegensatz zur Zellzahl an Tag 6, auf die die Glucosezugabe keinen Effekt ausübte, zeigten Kulturen mit 2% HS und Glucose eine Verminderung der Stimulation mit PWM im Vergleich zu Kulturen nur mit 2% HS. Alleinige Erhöhung des Glucosegehaltes im Medium ergab keinen Einfluß auf die Stimulationsergebnisse (Tab.13).

Säugerplasma enthält ein α_2 -Globulin, das selektiv Thyroxin bindet und normalerweise den größten Anteil der zirkulierenden Schilddrüsenhormone trägt. Dieses Protein fehlt im Vogelblut, in dem Thyroidhormone in freier Lösung und schwach an Albumin oder pre-Albumin gebunden transportiert werden. Zusatz von Thyroxin zum Kulturmedium (ohne Serum) zeigte keine positive Wirkung auf die Zellzahl und den ^3H -Tdr-Einbau (Tab. 13).

4.1.3. Zusammenfassung der Zellgewinnung und Kultivierung

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die aviären Blutlymphozyten wie folgt gewonnen und kultiviert:

- a. Gewinnung über Ficoll-Gradienten
- b. 2.5×10^7 Zellen/10 ml Kulturmedium* werden über 6 Tage in Falconflaschen mit Fütterung an Tag 3 kultiviert
- c. als Mediumzusatz dient 2 % inaktiviertes Hühnerserum und 2-ME (5×10^{-5} mmol/l)

Tab.13 : Wirkung verschiedener Zusätze auf die Zellzahlen
an Tag 6 ¹⁾ und die Stimulationsindices ¹⁾ (Si)

Zusätze	n	Zellzahl ($\times 10^6$)		
		ohne PWM	10 μ l/ml PWM	Si
Ovalbumin 0	9	1.60 $\pm$ 1.39	3.30 $\pm$ 1.85	0.86 ^a $\pm$ 0.34
(mg/ml) 0.02	9	1.87 $\pm$ 0.82	3.16 $\pm$ 2.47	0.67 ^a $\pm$ 0.42
0.05	9	2.87 $\pm$ 1.57	3.29 $\pm$ 2.17	0.67 ^a $\pm$ 0.30
0.10	9	2.90 $\pm$ 1.79	3.60 $\pm$ 2.44	0.83 ^a $\pm$ 0.52
Glucose 0	8	3.74 $\pm$ 1.62	3.84 $\pm$ 2.55	3.00 ^c $\pm$ 2.17
(mg/ml) 0.5	8	2.72 $\pm$ 1.20	2.63 $\pm$ 2.37	3.98 ^c $\pm$ 3.11
1.0	8	2.37 $\pm$ 0.86	3.33 $\pm$ 1.68	4.69 ^c $\pm$ 4.05
0 + 2%HS	11	0.64 $\pm$ 0.38	3.44 $\pm$ 2.30	37.38 ^a $\pm$ 19.90
0.5+2%HS	7	0.40 $\pm$ 0.14	2.55 $\pm$ 0.92	30.24 ^{ab} $\pm$ 18.05
1.0+2%HS	7	0.48 $\pm$ 0.25	2.80 $\pm$ 0.93	15.36 ^b $\pm$ 8.85
Thyroxin 0	8	0.77 $\pm$ 0.22	2.78 $\pm$ 1.20	1.64 ^a $\pm$ 0.58
(10 ⁻⁴ mg/ 1.2	8	0.88 $\pm$ 0.95	2.15 $\pm$ 0.72	2.21 ^a $\pm$ 1.66
ml) 6.0	8	1.01 $\pm$ 0.90	3.04 $\pm$ 1.33	1.97 ^a $\pm$ 0.72
0 + 2%HS	8	0.63 $\pm$ 0.22	3.78 $\pm$ 2.07	20.91 ^b $\pm$ 16.30

a, b, c, signifikant unterschiedlich
($p < 0.05$)

¹⁾ Mittelwert ($\bar{x}$) $\pm$ SD

4.2. Zelluläre Aktivitäten

Bei der Testung der zellulären Immunreaktionen in vitro wurde neben der Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit nichtspezifischen Mitogenen, das Verhalten histokompatibler Lymphozyten in der Kokultur, sowie die Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf die Stimulierbarkeit aviärer Lymphozyten untersucht.

4.2.1. Mitogene Stimulierung

Zur Überprüfung der Stimulierbarkeit von Hühnerlymphozyten mit nichtspezifischen Mitogenen, wurde neben PWM (Stimulation von B- und T-Zellen; Weber 1973), ConA und PHA (Stimulation von T-Lymphozyten; Toivanen and Toivanen 1973b; Weber 1973a) auch LPS, ein B-Zellmitogen (Hovi et al. 1978) eingesetzt.

4.2.1.1. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit PWM

Kinetische Untersuchungen der PWM-induzierten (10 μ l/ml) Proliferation von KO-Lymphozyten zeigten einen Anstieg der Antwort über 6 Tage (Tab.14).

Unter Verwendung unterschiedlicher Mitogenkonzentrationen (0 - 30 μ l/ml) wurde die Stimulierbarkeit von KO-, NO- und DYS-Lymphozyten nach 6-tägiger Kultivierung getestet.

Es zeigte sich, daß man zwischen schwach stimulierbaren Tieren (maximaler Si < 5) und stark stimulierbaren (maximaler Si > 50) unterscheiden kann. Hierbei war keine Abhängigkeit vom Versuchstag zu beobachten. So spiegelt die individuell stark

Tab.14 : Stimulationsindex (Si) von KO-Lymphozyten nach unterschiedlicher Kulturdauer mit dem Mitogen PWM (10 μ l/ml)

Tier Nr.	Tage				
	1	2	3	4	5
1	1.11	1.65	6.02	16.44	20.96
2	0.06	1.44	3.71	26.05	26.34
3	0.26	2.51	4.51	23.12	18.73
4	0.15	1.99	5.08	17.99	18.60
5	0.08	2.11	5.63	28.53	34.16
6	1.22	3.00	7.86	26.11	27.04
$\bar{x}$	0.48 ^a	2.12 ^b	5.47 ^c	23.04 ^{de}	24.30 ^e
$\pm$ SD	0.54	0.57	1.43	4.85	6.06

a,b,c,d,e, signifikant unterschiedlich
($p < 0.05$)

unterschiedliche Antwort auf ein Mitogen die Reaktionsfähigkeit des Einzeltieres wider (Keightley et al.1976; Pink et al.1977). Daraus ergeben sich die relativ hohen Standardabweichungen bei den Mittelwerten der getesteten Hühnerlymphozyten.

Zuerst erfolgt die Betrachtung der jeweiligen Gesamtpopulation. Abb.6 und Tab.15 zeigen die Stimulationsindices aller KO-Einzeltiere bei den verwendeten Mitogenkonzentrationen. Bis zu einer PWM-Konzentration von 15 $\mu\text{l/ml}$ steigt die Proliferation der KO-Lymphozyten kontinuierlich bis zu einem Si von 26.55 an, um bei weiterer Konzentrationserhöhung abzusinken (Abb.6).

Bei den normogammaglobulinämischen Tieren induzieren die niedrigen PWM-Konzentrationen höhere Proliferationsraten als bei den KO-Tieren (Tab.18). Die Stimulationswerte erreichen aber bereits bei 10 $\mu\text{l/ml}$ das Maximum ($\text{Si} = 21.57$) und sinken bei höheren PWM-Konzentrationen langsam ab (Abb.6; Tab.16).

Trotz Immundefizienz zeigten Einzeltiere der dysgammaglobulinämischen Hühner Stimulationswerte über 100 (Abb.6; Tab.17). Mit einem Maximum bei 20 $\mu\text{l/ml}$ und einem Index von 46.6 liegt nicht nur ihr Konzentrationsoptimum deutlich höher als bei KO und NO sondern auch ihre Stimulationsfähigkeit ist signifikant erhöht (Tab.18).

Um sicherzustellen, daß die Stimulationswerte der verschiedenen Tiergruppen nicht durch die unterschiedliche Überlebensfähigkeit der Zellen beeinflußt wurde, wurden die Zellzahlen nach 6-tägiger Kultivierung vergleichend betrachtet. Es zeigte sich, daß

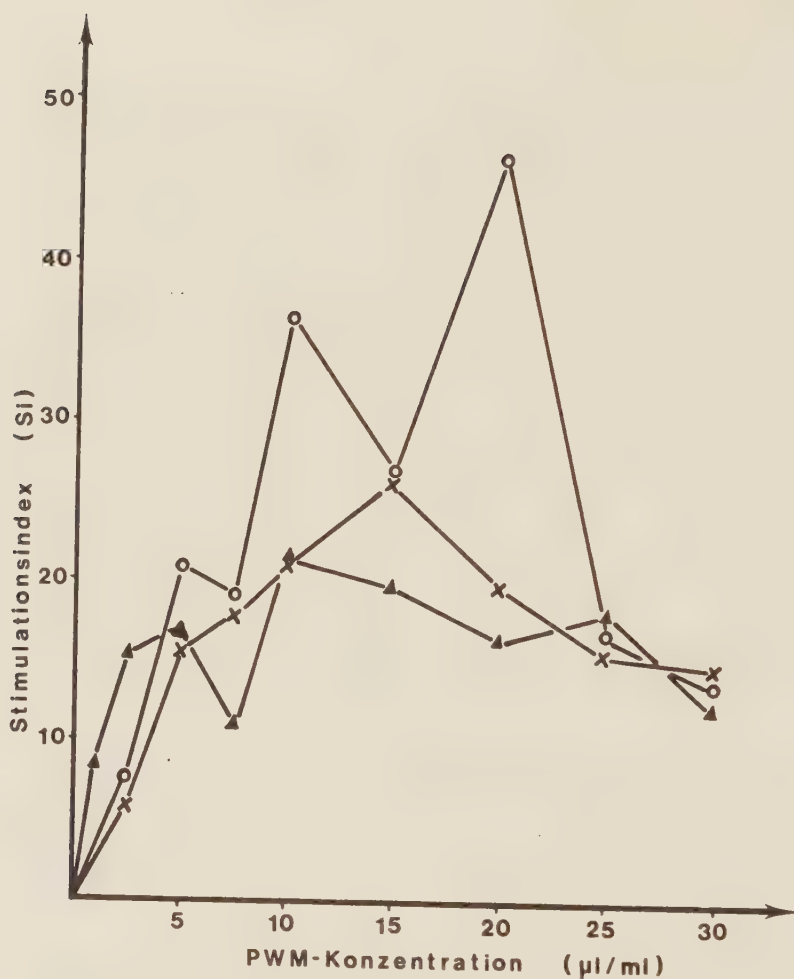


Abb.6 : Stimationsindices (Si) in Abhängigkeit von der PWM-Konzentration bei aviären, peripheren Blutlymphozyten

- x— Kontrollhühner
- ▲— normogammaglobulinämische Hühner
- dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.15 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der PWM-Konzentration bei peripheren Lymphozyten von Kontrollhühnern

Tier Nr.	PWM-Konzentration (µl/ml)								
	2.50	5.00	7.50	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00	
942	2.21	0.91	6.38	7.65		4.67			M
936	4.79	2.71	5.97	2.88		6.83			M
940	0.95	0.88	1.96	3.29		2.50			L
945	0.66	1.14	1.36	3.21		2.80			L
938	1.10	0.88	2.74	3.01		8.28			M
944	23.78	18.48	31.79	30.71		16.65			M
935	2.09	4.65	3.78	6.11		58.93			H
941	2.70	4.22	71.8	4.16					M
611		13.08	25.44		8.81	4.71			M
612		9.81	9.25		10.97	11.17			M
613		14.83	9.45		4.13	6.55			M
614				47.98	42.35	62.03			H
615				47.86	53.70	66.92			H
616				64.09	181.32	115.44			H
617		7.14		6.05		6.50			M
618		16.09		5.40		18.03			M
619		30.48		33.30		36.48			M
620		5.16		7.12		8.04			M
969		3.08	2.94	3.28	0.32	0.35			L
892		39.17	23.51	75.62	63.70	12.92			H
869		104.90	164.78	86.39	3.50	1.41			H
966		7.47	22.64	20.96	1.36	0.86			M
621	3.43	1.40		2.22		0.31			L
622	2.11	2.51		3.31		7.00			M
623	14.72	18.20		21.37		30.64			M
624	13.73	55.08		73.72		57.67			H
3351			9.17	8.73	12.20	22.11	24.17	31.51	M
2278			13.08	12.54	16.69	21.48	34.27	25.25	M
151			9.07	8.63	8.26	10.54	14.48	19.74	M
154			5.32	4.74	7.82	7.30	4.74	2.11	M
161			4.48	4.51	5.47	3.20	10.34	5.50	M
157			14.76	16.91	4.26	4.50	5.41	4.71	M
$\bar{x}$	6.02 ^a	15.75 ^{ab}	17.86 ^b	21.23 ^{ab}	26.55 ^{ab}	19.90 ^{ab}	15.57 ^b	14.80 ^{ab}	
±SD	7.35	23.76	34.72	25.44	45.58	26.37	11.60	12.35	

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

H = high responder; M = medium responder; L = low responder

Tab.16 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der PWM-Konzentration bei peripheren Lymphozyten normogammaglobulinämischer Hühner

Tier Nr.	PWM-Konzentration (µl/ml)										
	1.00	2.50	5.00	7.50	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00		
1474		19.24	20.87	22.06	34.19	31.18	34.69			M	
1228		21.78	63.40	18.90	87.34	83.06	77.14			H	
976		3.38	7.93	19.87	27.62	29.11	20.35			M	
1474		29.98	34.42	18.98	11.26	11.20	8.20			M	
1492		1.76	2.73	3.74	4.95	4.31	4.63			L	
1475		8.49	11.54	7.24	11.98	13.41	7.12			M	
1478		36.21	25.48	6.87	10.56	15.45	7.14			M	
210			2.82		11.95		7.86			M	
211			2.42		6.91		3.86			M	
404	8.45	1.71	5.58		4.00		5.42			M	
414	7.61	29.55	47.44		46.30		21.77			M	
417	2.60	1.86	2.81		3.47		5.26			M	
424	13.42	18.98	33.69		80.75		36.76			H	
212				12.30	8.63	8.61	7.52			M	
958			3.86	5.53	4.74	11.23	5.09			M	
1124			2.68	4.65	4.51	5.49	11.94			M	
957			5.97	7.41	7.61	21.18	18.66			M	
2613	6.54			12.83	30.74	21.61		30.35	18.68	M	
2616	9.31			14.04	20.61	29.37		37.16	21.57	M	
2407	16.44			6.80	11.48	7.77		10.32	7.38	M	
2444	10.20			6.12	5.10	4.60		7.19	4.52	M	
2421	5.86			11.16	22.50	21.87		9.13	12.86	M	
2420	5.74			13.00	17.84	18.72		16.80	10.98	M	
$\bar{x}$	8.62 ^a	15.72 ^a	17.10 ^a	11.26 ^a	21.57 ^a	20.15 ^a	16.84 ^a	18.49 ^a	12.66 ^a		
$\pm\text{SD}$	4.01	12.89	18.81	5.88	26.35	18.39	16.52	12.44	6.52		

H = high responder; M = medium responder; L = low responder

Tab.17 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der PWM-Konzentration bei peripheren Lymphozyten dysgammaglobulinämischer Hühner

Tier Nr.	PWM-Konzentration (µl/ml)								
	2.50	5.00	7.50	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00	
1580	2.50	2.67	6.72	19.13	30.44	44.58			M
1579	41.82	148.24	130.06	183.35	115.52	201.59			H
1583	6.79	15.20	11.68	11.95	14.70	17.82			M
1581	2.80	0.83	0.96	0.86	2.13	3.70			L
1584	1.57	5.03	8.64	14.16	47.13	60.87			H
1577	4.04	9.67	16.27	20.36	23.25	36.39			M
1578	17.48	61.51	60.11	62.97	100.68	142.14			H
1503	3.87	8.52	10.47	13.72	12.57	23.42			M
1578	11.34	15.52	22.62	75.79	37.79	211.00			H
1594	1.47	1.77	5.69	3.11	8.59	3.99			M
1577	1.89	6.02	6.49	4.69	3.53	11.88			M
1506	2.66	4.63	3.71	4.48	4.86	4.08			L
1512	2.30	7.41	8.94	53.25	20.26	52.72			H
1356	9.26	15.81	17.68	9.92	16.91	14.71			M
1511	4.24	8.31	19.34	71.27	47.03	44.05			H
2411			11.32		14.84	13.49	20.17	10.74	M
2408			16.84		13.67	18.49	20.10	33.67	M
2585			2.30		3.04	3.78	3.07	2.06	L
1834			10.47		14.61	14.43	15.07	9.70	M
2409			18.27		22.99	24.14	20.90	15.07	M
2412			12.42		11.21	31.23	21.29	11.00	M
$\bar{x}$	7.60 ^a	20.74 ^b	19.09 ^b	36.60 ^b	26.94 ^b	46.59 ^b	16.77 ^{ab}	13.71 ^{ab}	
±SD	10.46	38.18	28.18	48.26	30.03	61.27	7.08	10.66	

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

H = high responder; M = medium responder; L = low responder

Tab.18 : Die Signifikanzen der Stimulationswerte bei steigender PWM-Konzentration innerhalb der drei Tiergruppen

Tiere	PWM (μ l/ml)							
	2.5	5	7.5	10	15	20	25	30
KO	a	a	a	a	a	a	a	a
NO	b	a	a	a	a	a	a	a
DYS	ab	a	a	a	a	b	a	a

a,b signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab.19 : Anzahl der lebenden Lymphozyten ($\times 10^6$) nach 6-Tage Kultur mit dem Mitogen PWM

Tiere	0	1	2.50	5	PWM ($\mu\text{l/ml}$)						25	30
					7.50	10	15	20	25	30		
KO	0.65 ± 0.41		2.78 ± 2.05	2.96 ± 2.43	4.69 ± 3.89	4.82 ± 4.61	4.90 ± 2.27	3.93 ± 3.46	4.17 ± 2.50	3.83 ± 2.87		
NO	1.04 ± 0.70	1.09 ± 0.65	3.75 ± 3.35	4.68 ± 3.09	5.57 ± 3.97	5.02 ± 3.00	4.99 ± 3.35	4.45 ± 3.21	4.40 ± 3.54	3.52 ± 1.89		
DYS	0.80 ± 0.53		3.19 ± 1.67	3.14 ± 2.06	3.77 ± 2.30	3.71 ± 2.46	4.15 ± 3.08	3.60 ± 2.18	3.86 ± 2.02	2.74 ± 1.85		

Tab.20 : Stimulationsindices (Si $\pm$ SD) in Abhängigkeit von der PWM-Konzentration bei peripheren, aviären Lymphozyten aufgeteilt in low (L), medium (M) und high (H) responders

Tiere		PWM (μ l/ml)								
		1.0	2.5	5.0	7.5	10	15	20	25	30
KO	L		1.68 $\pm$ 1.52	1.62 $\pm$ 0.99	2.09 $\pm$ 0.80	3.00 $\pm$ 0.52	0.32 -	1.49 $\pm$ 1.35		
	M		6.11 $\pm$ 8.74	10.13 $\pm$ 8.34	11.78 $\pm$ 8.46	11.22 $\pm$ 9.51	8.00 $\pm$ 4.50	11.79 $\pm$ 9.54	15.57 $\pm$ 11.60	14.80 $\pm$ 12.35
	H		7.91 $\pm$ 8.23	50.95 $\pm$ 41.67	64.02 $\pm$ 87.81	57.40 $\pm$ 26.75	56.31 $\pm$ 41.50	53.62 $\pm$ 37.63		
NO	L		1.76 -	2.73 -	3.74 -	4.95 -	4.31 -	4.63 -		
	M	8.08 $\pm$ 3.86	16.30 $\pm$ 14.23	13.37 $\pm$ 14.44	11.26 $\pm$ 5.59	13.84 $\pm$ 12.92	17.01 $\pm$ 8.68	13.44 $\pm$ 9.16	18.49 $\pm$ 12.44	12.66 $\pm$ 6.52
	H	13.42 -	20.38 $\pm$ 1.98	48.54 $\pm$ 21.00	18.90 -	84.04 $\pm$ 4.66	83.06 -	56.95 $\pm$ 28.55		
DYS	L		2.73 $\pm$ 0.10	2.73 $\pm$ 2.69	2.32 $\pm$ 1.37	2.67 $\pm$ 2.56	3.34 $\pm$ 1.39	3.85 $\pm$ 0.20	3.07 -	2.06 -
	M		4.26 $\pm$ 2.83	8.52 $\pm$ 5.55	12.03 $\pm$ 4.44	11.84 $\pm$ 6.59	15.61 $\pm$ 7.16	21.21 $\pm$ 11.44	19.51 $\pm$ 2.53	16.04 $\pm$ 10.07
	H		13.12 $\pm$ 15.33	41.00 $\pm$ 56.68	41.62 $\pm$ 47.28	76.80 $\pm$ 56.66	61.40 $\pm$ 37.77	118.73 $\pm$ 76.43		

unter den gewählten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl bei den drei Tiergruppen beobachtet werden konnten (Tab.19).

Die Unterteilung der Tiere auf Grund ihrer maximal erzielten Stimulation in low (L; Si < 5), medium (M, Si 5-50) und high (H, Si > 50) responders ergab in den Tiergruppen folgendes Bild (Tab.20): es zeigte sich, daß die M-Tiere immer den größten Teil der Population darstellten und die L-Tiere nur vereinzelt auftraten. Auch die immundefizienten DYS-Tiere zeigten innerhalb ihrer Population sowohl L-, als auch M- und H-Tiere.

4.2.1.2. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit ConA

Nach dem B-T-Zellmitogen PWM wurde das Verhalten der Lymphozyten auf das T-Zellmitogen ConA untersucht. Ebenso wie bei PWM wurden schwach und stark stimulierbare Tiere beobachtet. Auch hier wird zuerst auf das Verhalten der Gesamtpopulation eingegangen.

Bei den Kontrolltieren kommt es zu einem sehr steilen Anstieg der Stimulationswerte bis zu einer ConA-Konzentration von 50 µg/ml. Mit einem Si-Wert von 60.70 zeigen sie ein deutliches Maximum (Abb.7; Tab.21),

Bei normogammaglobulinämischen Hühnern erhöht sich die Proliferationsrate mit steigender Mitogenmenge kontinuierlich bis 70 µg/ml und erreicht einen Stimulationsindex von 41.98 (Tab.22). Abb.7 zeigt die Verschiebung der optimalen Proliferationsbedin-

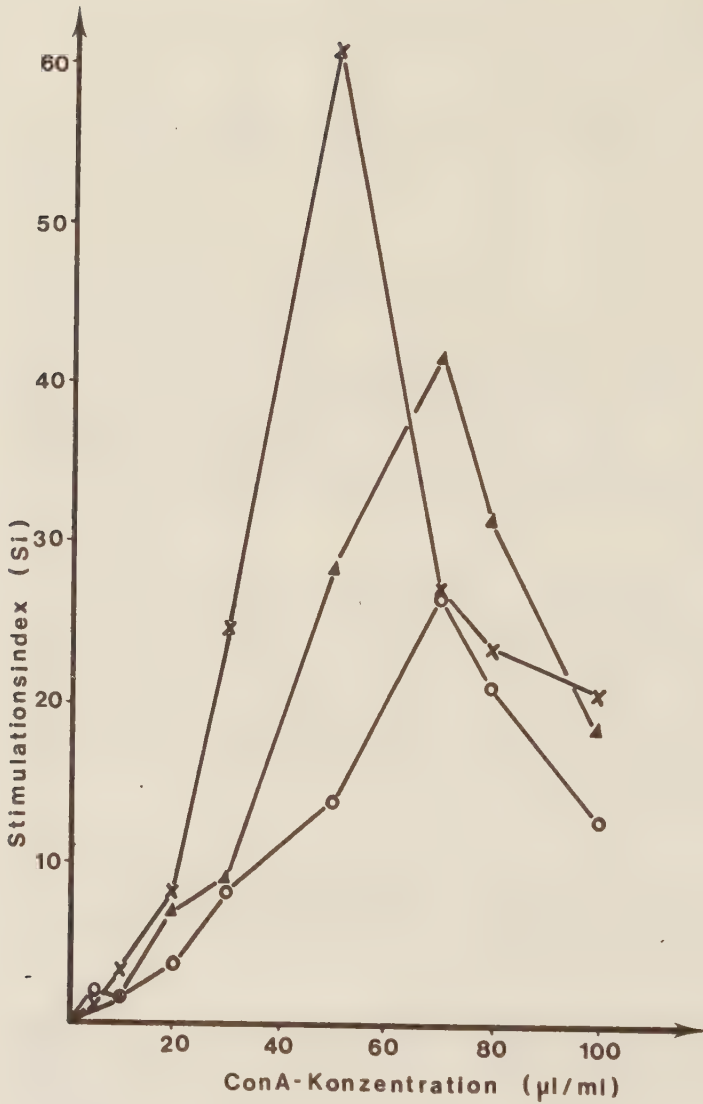


Abb.7 : Stimationsindices (Si) in Abhängigkeit von der ConA-Konzentration bei aviären, peripheren Blutlymphozyten

- x— Kontrollhühner
- ▲— normogammaglobulinämische Hühner
- dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.21 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der ConA-Konzentration bei peripheren Lymphozyten von Kontrollhühnern

Tier Nr.	ConA-Konzentration (µg/ml)								
	5.00	10.00	20.00	30.00	50.00	70.00	80.00	100.00	
1444		2.39	3.11	4.39	44.67				M
1445		0.88	1.44	22.13	11.53				M
1443		0.49	5.78		34.16				M
910	1.14		0.85	2.05	4.38				L
911	0.68	1.03	0.82		3.87				L
912	1.21	3.12	11.46	7.99	48.26				M
913	1.64	1.46	1.35	2.02	7.66				M
696		1.71	1.47	3.70	20.59	34.26			M
996		1.75	6.02	4.17	12.26	16.08			M
1121		3.80	2.21	2.99	2.58	3.57			L
1219		3.21	2.57	2.58	3.16	16.30			M
875		5.37	28.23	48.41	264.25	18.12			H
881		1.46	26.18	25.48	9.31	1.44			M
869		17.81	24.83	61.09	227.90	8.05			H
892		1.97	28.50	25.22	11.60	3.12			M
877		1.53	1.35	2.63	8.98	62.35			H
890		2.66	1.41	13.29	24.43	98.47			H
891		4.02	3.32	166.54	261.78	43.64			H
866		8.87	8.34	24.63	184.82	24.10			H
1147	1.68				69.81	42.64	39.11	40.05	H
5542	0.97				96.43	37.12	26.08	20.59	H
3351	1.84				38.98	32.35	33.64	33.37	M
2278	1.05				19.31	21.50	18.47	18.21	M
151	1.17				22.58	17.81	11.53	4.08	M
157	1.26				84.16	11.46	13.21	8.12	H
$\bar{x}$	1.26 ^a	3.53 ^{ab}	8.38 ^{bc}	24.66 ^{acd}	60.70 ^d	27.35 ^d	23.67 ^d	20.74 ^d	
±SD	0.36	4.07	10.24	40.44	82.46	24.09	11.20	13.97	

a, b, c, d, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

H = high responder, M = medium responder; L = low responder

Tab.22 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der ConA-Konzentration bei peripheren Lymphozyten normogammaglobulinämischer Hühner

Tier Nr.	ConA-Konzentration (µl/ml)							
	10.00	20.00	30.00	50.00	70.00	80.00	100.00	
310	1.00	2.27	6.61	6.20	2.86			M
301	2.14	5.54	22.89	2.03	2.26			M
211	3.53	4.71	2.61	1.17	0.94			L
210	2.57	77.15	3.27	1.89	1.47			H
11	1.46	1.18	2.17	47.41	14.38			M
33	1.23	1.30	5.96	2.08	15.99			M
2101	1.19	1.69	13.30	9.78	2.54			M
2111	3.11	3.24	7.83	6.61	9.10			M
1618	2.01	5.02	10.09	60.36	89.42			H
1630	2.85	3.98	10.98	42.92	182.36			H
1631	1.37	1.37	10.24	49.70	160.72			H
1663	4.04	13.28	38.32	81.98	128.88			H
1712	0.53	0.71	1.70	5.70	23.74			M
1714	1.65	2.46	2.63	8.31	26.01			M
1723	1.01	0.59	3.48	32.96	26.97			M
1734	0.98	1.32	10.36	74.42	42.84			H
1468	1.50	2.30	4.73	131.13	3.50			H
1563	2.00	16.42	15.61	3.26	2.58			M
2613		3.59		29.78	49.92	46.74	40.12	M
2616		8.32		26.51	40.54	41.30	38.03	M
2407		7.30		9.80	13.17	7.46	4.73	M
2421		2.19		11.32	24.38	23.48	20.24	M
1228	2.17			38.42	60.39	38.32	12.47	H
424	0.98			31.34	71.30	30.94	12.26	H
425	1.85			13.48	58.38	28.61	10.19	H
2420	2.85			16.82	36.89	37.98	11.65	M
$\bar{x}$	1.91 ^a	7.54 ^{ab}	9.60 ^b	28.67 ^c	41.98 ^c	31.85 ^c	18.71 ^{bc}	
±SD	0.92	16.06	9.06	31.25	49.26	12.34	13.27	

a, b, c, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

H = high responder; M = medium responder; L = low responder

Tab.23 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der ConA-Konzentration bei peripheren Lymphozyten dysgammaglobulinämischer Hühner

Tier Nr.	ConA-Konzentration (µl/ml)								
	5.00	10.00	20.00	30.00	50.00	70.00	80.00	100.00	
1491		0.93	1.16	6.88	11.56	1.25			M
1400	1.83	1.26	4.41	5.89	25.87	14.93			M
1386	3.64	3.88	5.74						M
1392	0.71	0.58	2.51	6.73					M
1358		1.76	1.76	2.07	4.33	7.17			M
1356		2.97	2.47	2.25	2.79	8.87			M
1369		2.83	11.17	11.00	33.03	125.89			H
1365		1.88	2.70	23.64	12.48	12.47			M
1536		2.08	2.41	5.50	1.67	82.56			H
1502		1.26	1.26	17.12	4.60	9.17			M
1482		1.18	1.16	1.39	9.11	16.52			M
1503		1.13	7.72	8.62	5.22	12.61			M
1579		1.87	1.16	2.50	4.39	2.22			L
1582		3.43	2.84	3.77	0.57	1.60			L
1580		1.26	2.59	2.62	28.51	13.40			M
1572		3.40	12.89	12.71	11.57	14.93			M
1662		1.13	3.29	24.21	16.79	63.88			H
1655		1.57	0.48	1.30	6.91	14.42			M
2411	3.02				29.16	58.07	42.89	39.40	H
2408	0.96				26.01	39.16	22.71	11.52	M
2585	1.88				26.97	38.00	5.25	6.61	M
1834	2.06				7.46	16.83	17.11	13.40	M
2409				7.82	13.30	26.52	18.26	2.18	M
2412				20.26	42.92	42.17	42.89	10.89	M
2268				0.96	2.85	9.87	3.78	4.49	M
1828				7.28	8.31	11.16	16.64	13.03	M
$\bar{x}$	2.01 ^a	1.91 ^a	3.76 ^{ab}	8.31 ^{bc}	14.02 ^{cd}	26.82 ^d	21.19 ^d	12.70 ^{cd}	
±SD	1.04	0.98	3.42	7.31	11.79	29.83	14.87	11.54	

a, b, c, d, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

H = high responder; M = medium responder; L = low responder

Tab.24 : Die Signifikanzen der Stimulationswerte bei steigender
ConA-Konzentration innerhalb der drei Tiergruppen

Tiere	ConA ($\mu\text{g/ml}$)						
	10	20	30	50	70	80	100
KO	a	a	a	a	a	a	a
NO	a	a	a	a	a	a	a
DYS	a	a	a	b	a	a	a

a,b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab.25 : Anzahl der lebenden Lymphozyten ($\times 10^6$) nach 6-Tage Kultur mit dem Mitogen ConA

Tiere	ConA (µg/ml)									
	0	5	10	20	30	50	70	80	100	
KO	0.78	0.65	0.88	2.31	2.91	2.39	1.50	1.67	1.53	
	±0.69	±0.40	±0.81	±1.41	±1.73	±2.20	±0.96	±0.98	±0.84	
NO	0.92		1.06	1.47	2.75	2.51	1.78	1.63	1.85	
	±0.65		±0.98	±1.26	±1.72	±2.22	±1.34	±1.41	±1.11	
DYS	0.81		0.56	1.19	1.83	2.35	2.14	1.99	2.03	
	±0.39		±0.25	±1.11	±1.05	±1.72	±1.59	±0.99	±1.37	

gung zu höheren Mitogenmengen bei NO-Lymphozyten im Gegensatz zu Kontrollen.

Ähnlich verhalten sich Lymphozyten von dysgammaglobulinämischen Hühnern (Abb.7; Tab.23). Auch sie zeigen ein Maximum bei 70 µg/ml ConA. Mit einem Si-Wert von 26.82 liegt ihr Kurvenverlauf deutlich unter denen von NO- und KO-Tieren (Abb.7; Tab.24). Die Ergebnisse zeigen, daß trotz Immundefizienz mit ConA eine Proliferationsanstieg erzielt werden kann. Der insgesamt niedrigere Kurvenverlauf spricht für eine mögliche Veränderung innerhalb der T-Zellpopulation.

Bezüglich der überlebenden Lymphozyten nach 6-tägiger Kultivierung mit verschiedenen ConA-Konzentrationen zeigten die drei Populationen keinen signifikanten Unterschied (Tab.25).

Hühner der verschiedenen Inzuchtlinien wurden in ihrem Verhalten gegen das T-Zellmitogen ConA als "high" (H) und "Low responders" (L) klassifiziert, wobei neben Koloniebildungsfähigkeit, Interleukin-2-Produktion und Veränderung der Zellzahl während der Kultivierung auch der ^3H -Tdr-Einbau in periphere Blutlymphozyten gemessen wurde (Pink et al.1977; Benedict et al.1980; Pink and Vainio 1983).

Die hier getesteten Tiergruppen wiesen high (H; $\text{Si} > 50$), middle (M; $\text{Si} 5-50$) und low (L; $\text{Si} < 5$) responder auf, wobei die M-Tiere immer den größten Teil der Population darstellten und die L-Tiere am wenigsten vertreten waren. Nach Aufteilung der Tiere innerhalb der Population ergab sich folgendes Bild

(Tab.26): die mit L bezeichneten Tiere zeigten bei den verschiedenen ConA-Konzentrationen keine deutliche Stimulation und keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Sie waren in den Populationen nur vereinzelt vertreten. Pink und Vainio 1983 führten dieses Verhalten auf eine verminderte proliferative Kapazität der "kleinen Lymphozyten" zurück, die durch die uneffektive ConA-Stimulation nicht zu Interleukin-2 sensitiven Blasten heranreifen können. Die Stimulationswerte der M- und H-Tiere der einzelnen Tiergruppen zeigten ähnliche Kurvenverläufe wie die entsprechenden Werte der Gesamtpopulationen. Somit wurde gezeigt, daß die getestete DYS-Population (n=24) ein ähnliches Verhältnis an L:M:H-Tieren aufweist, und daß ihr niedrigerer Kurvenverlauf nicht auf ein überproportionales Vorkommen von L-Tieren zurückzuführen ist.

4.2.1.3. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit PHA und LPS

Zugabe von PHA, einem weiteren T-Zellmitogen, in verschiedenen Konzentrationen (0 - 30 µg/ml) zu KO-Lymphozyten zeigte keinerlei Stimulation nach 6-tägiger Kultivierung (Tab.27). Kinetische Untersuchungen mit 20 µg/ml PHA ergaben an Tag 3 und Tag 4 eine leichte Stimulation (Tab.28), jedoch zu geringe Werte, um die Versuche auf die anderen Tiergruppen auszudehnen.

Ebenso wurde mit dem B-Zellmitogen LPS weder im Verlauf von 5 Tagen (Tab.28) noch mit verschiedenen Mitogenkonzentrationen bei den drei Tiergruppen Stimulation induziert (Tab.29).

Tab.27 : Stimulationsindex (Si) in Abhängigkeit von der
PHA-Konzentration bei Lymphozyten von Kontroll-
hühnern (n = 12)

	PHA (µg/ml)				
	5	10	15	20	50
$\bar{x}$	0.75	0.85	0.92	0.64	0.54
$\pm SD$	0.31	0.23	0.40	0.32	0.21

Tab.28 : Stimulationsindex (SI)¹⁾ von KO-Lymphozyten nach
unterschiedlicher Kulturdauer mit den Mitogenen
PHA und LPS

Mitogen	n	Tage				
		1	2	3	4	5
PHA	11	1.10	1.35	2.14	2.05	0.93
(20µg/ml)		± 0.53	± 0.71	± 1.74	± 1.77	± 0.45
LPS	6	0.52	0.83	1.02	1.08	1.36
(100µg/ml)		± 0.23	± 0.19	± 0.77	± 0.67	± 0.30

1) ($\bar{x} \pm SD$)

Tab.29 : Stimulationsindex (SI)¹⁾ in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration bei Lymphozyten von KO-, NO- und DYS-Hühnern

Tiere	n	LPS (µg/ml)				
		10	20	50	100	150
KO	9	1.21	1.14	1.10	1.39	1.49
		±0.14	±0.28	±0.19	±0.34	±0.71
NO	5		1.54	1.57	1.44	1.28
			±0.56	±0.47	±0.76	±0.28
DYS	5		1.06	1.14	1.30	1.32
			±0.17	±0.25	±0.17	±0.20

1) ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.2. Zelltrennung

Getestet wurde die Stimulierbarkeit (PWM 10 μ l/ml) von peripheren KO-Lymphozyten nach Entfernung der adherenten Zellen durch Adhärenz an Plastik oder der Trennung von B- und T-Lymphozyten über Nylonwolle. Die Reinheit der einzelnen Zellfraktionen wurde mit Hilfe des Erythrozyten-Antikörper-Rosettentestes überprüft (Böhringer et al.1983).

Bei der Adhärenz der Makrophagen an Plastik (30 min bei 37°C) blieben 40 - 60% der Zellen haften. Bezüglich der Zellzahl an Tag 6 zeigten die wiedergewonnenen (durch vorsichtiges Abschaben mit einem Gummirubber) adherenten Zellen deutlich verminderte Werte (Tab.30). Die Stimulierbarkeit mit PWM verminderte sich in Kulturen ohne adherente Zellen signifikant. Auch die wiedergewonnenen B-Zellen zeigten nur geringe Stimulierbarkeit (Tab.30).

Die Zelltrennung über Nylonwolle ergab eine Ausbeute von circa 60%, wobei es sich um eine zu 95%B-Zellfreie T-Lymphozytenfraktion handelte. Dies entspricht der B-T-Verteilung im Hühnerblut mit 60 - 80% T-Zellen. B-Zellen konnten von der Säule durch Nachwaschen und Ausdrücken der Watte nur in geringem Umfang gewonnen werden. Diese Fraktion war immer mit T-Zellen verunreinigt. Die Zellausbeute an Tag 6 mit und ohne PWM ergab, daß die kultivierten T-Zellen deutlich besser überlebten als ungetrennte Lymphozyten oder B-Zellen alleine (Tab.31). Bei der Stimulierung zeigte sich eine signifikante Abnahme des Stimulationsindex nach B-Zellentfernung. Den gleichen Befund

Tab.30 : Stimulationsindices (Si) und Zellzahlen nach 6-tägiger Stimulation mit PWM (10 µl/ml) von ungetrennten (PBL) KO-Lymphozyten und nach Entfernung der adherenten Zellen (Ad.Z.)

Tier Nr.	Si			Zellzahl ($\times 10^6$)					
	PBL	PBL	Ad.Z.	PBL		PBL - Ad.Z.		Ad.Z.	
		-Ad.Z.		0	PWM	0	PWM	0	PWM
1	12.46	0.75		1.88	1.64	1.35	1.88		
2	15.79	8.09		0.87	2.18	1.46	4.80		
3	6.58	1.42		1.56	1.91	1.84	1.50		
4	7.94	6.73		1.17	1.44	1.06	1.58		
5	5.64	3.41		1.20	1.63	0.97	1.32		
6	16.80	1.40	1.65	0.38	0.70	0.56	1.42	0.36	0.56
7	6.31	1.00	1.10	0.48	1.08	0.58	0.80	0.60	1.16
8	4.23	1.04	1.43	0.72	0.96	0.52	1.80	0.50	0.64
9	4.69	1.09	1.11	0.91	1.46	0.66	1.32	0.72	0.77
10	12.61	1.85	1.47	0.48	1.65	0.98	1.48	0.34	0.52
11	16.50	6.72	2.32	0.35	1.09	0.49	1.87	0.29	0.38
12	13.10	1.28	1.16	0.59	2.33	0.59	1.54	0.71	0.68
$\bar{x}$	10.22 ^b	2.90 ^a	1.46 ^a	0.88	1.51	0.92	1.77	0.50	0.67
$\pm$ SD	4.80	2.67	0.43	0.49	0.49	0.44	1.00	0.18	0.25

a,b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab.31 : Stimulationsindices (Si) und Zellzahl nach 6-tägiger Stimulation mit PWM (10 μ l/ml) von ungetrennten (PBL) und über Nylonwolle getrennten KO-Lymphozyten (B bzw. T)

Tier Nr.	Si			Zellzahl ($\times 10^6$)					
	PBL	B	T	PBL		B		T	
				0	PWM	0	PWM	0	PWM
1	7.10		0.49	0.60	2.30			3.00	2.60
2	4.90		0.79	0.40	2.00			4.00	8.00
3	6.29		0.65	0.30	0.90			1.00	3.00
4	8.49		1.94	1.00	10.00			5.70	13.00
5	19.70		0.74	0.40	9.70			3.20	8.30
6	39.00		2.03	2.60	2.40			5.70	8.00
7	34.92	3.15	1.58	0.40	1.20	0.50	0.50	3.80	4.00
8	15.73	1.68	0.36	0.50	3.50	0.20	0.30	0.30	0.80
9	21.43	1.64	0.23	0.60	5.20	0.10	0.50	3.00	5.00
10	31.95	1.44	0.10	0.60	3.80	0.50	0.80	3.00	5.00
11	8.38	0.53	1.29	0.50	1.50	0.10	0.25	2.00	2.50
12	5.78	1.17	0.60	0.55	2.00	0.10	0.10	0.30	0.50
13	11.98	1.21	1.07	0.45	0.62	0.23	0.27	1.24	1.54
14	5.78	1.79	0.35	0.80	2.50	0.20	0.20	0.80	2.70
15	3.55	1.43	1.37	1.97	1.89	2.22	1.60	4.20	6.00
16	2.17	2.89	1.50	2.10	1.80	1.60	1.00	5.00	6.70
17	3.55	1.75	1.37	0.81	1.17	0.50	0.48	1.30	3.01
$\bar{x}$	13.57 ^b	1.70 ^a	0.98 ^a	0.86	3.09	0.57	0.54	2.80	4.74
$\pm$ SD	11.78	0.74	0.60	0.68	2.78	0.70	0.44	1.79	3.28

a,b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

ergaben auch die von der Säule wiedergewonnenen B-Zellen (Tab.31).

Eine Abnahme der PWM-Stimulation nach Trennung von aviären Milzzellen über Nylonwolle wurde auch von Hovi et al.1978 beschrieben.

Wie im menschlichen System (Hirano et al.1977) benötigen also auch die aviären, peripheren B-Zellen T-Zellen für die PWM-induzierte Proliferation. Weiterhin konnte gezeigt werden (für die späteren Ko-Kultorexperimente 4.3.2.), daß die T-Zellen durch die Trennung über Nylonwolle nicht geschädigt werden (siehe Überlebensrate an Tag 6; Tab.31).

4.2.3. Kokultur

Ungetrennte, periphere, histokompatible UM-B19 Lymphozyten wurden nach Separierung im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl $2.5 \times 10^7 / 10 \text{ml}$) mit und ohne PWM über 6 Tage kultiviert und anschließend über 20 Stunden mit ^3H -Tdr markiert. Untersuchungen zum ^3H -Tdr-Einbau von NO- und DYS-Kombinationen zeigten ohne Mitogen keine Unterschiede. Auch bei Zugabe von 50 oder 200 μl PWM/Kultur veränderte sich der ^3H -Tdr-Einbau und die Stimulationswerte in den Kombinationen NO/NO, NO/DYS und DYS/DYS nicht signifikant (Tab.32).

Die Zellzahl nach 6-tägiger Kultivierung zeigt Tab.33. Ohne Mitogen wurden in den Kombinationen kein Unterschied beobachtet. Bei Mitogenzugabe zeigten die Kombinationen NO/NO, DYS/DYS und NO/DYS höhere Zellzahlen als die NO- oder DYS-Ansätze.

Somit zeigen histokompatible NO/DYS-Kombinationen keinen Effekt

Tab.32 : ^3H -Tdr Einbau (cpm) und Stimulationsindices (Si)
in drei Kokultorexperimenten mit Lymphozyten von
histokompatiblen normogammaglobulinämischen und dys-
gammaglobulinämischen Hühnern

Kombinationen	PWM ($\mu\text{l}/10\text{ml}$)				
	0	50	200	50	200
		cpm		Si	
NO1	1626	14266	6747	8.77	4.15
NO2	2183	9012	7137	4.13	3.27
DYS1	966	7632	10341	7.90	10.70
DYS2	1404	7399	22522	5.27	16.04
NO1 + NO2	1366	8934	6434	6.54	4.71
NO1 + DYS1	1289	12802	14180	9.93	11.00
NO1 + DYS2	992	7658	15160	7.92	15.28
NO2 + DYS1	1076	10264	12195	9.54	11.33
NO2 + DYS2	818	3614	6464	4.42	7.90
DYS1 + DYS2	1724	12585	12567	7.30	7.29
NO1	663	10953	21524	16.52	33.46
NO2	557	5670	8111	10.18	14.56
DYS1	591	5928	8661	10.03	14.65
NO1 + NO2	707	9623	9006	13.61	12.74
NO1 + DYS1	545	7481	17555	13.73	32.21
NO1 + DYS2	650	6894	8862	10.61	13.63
NO2 + DYS1	663	7199	4156	10.86	6.27
NO2 + DYS2	660	5214	4511	7.90	6.83
DYS1 + DYS2	741	4306	6221	5.81	8.39
NO1	354	12501	14009	35.80	39.50
NO2	367	10697	9330	29.10	25.40
DYS1	641	2220	1236	3.40	1.90
DYS2	592	8285	12885	13.90	21.70
NO1 + NO2	468	11092	12542	23.70	26.80
NO1 + DYS1	570	5971	12540	10.40	22.00
NO1 + DYS2	364	7552	9330	20.70	25.60
NO2 + DYS1	368	8222	5396	22.30	14.60
NO2 + DYS2	677	9192	12359	13.50	18.20
DYS1 + DYS2	1146	5164	7046	4.50	16.10

Tab.33 : Zellzahlen ($\times 10^6$) nach 6-tägiger Kokultivierung histokompatibler Lymphozyten aus den Versuchen der Tabelle 32

ohne PWM					PWM (50 μ l/10ml)					PWM (200 μ l/10ml)				
NO	DYS	NO/NO	NO/DYS	DYS/DYS	NO	DYS	NO/NO	NO/DYS	DYS/DYS	NO	DYS	NO/NO	NO/DYS	DYS/DYS
0.97	2.10	0.61	1.20	1.50	8.0	2.8	7.2	4.6	3.6	5.0	2.4	7.2	4.8	3.7
0.49	1.30		2.0		7.8	2.5		7.4		7.0	2.19		5.2	
			1.0					6.2					5.1	
			1.5					7.7					8.6	
1.90	0.70	2.2	1.0	0.42	2.3	1.5	2.8	7.0	4.2	1.4	0.45	3.4	6.3	2.3
0.7	1.6		2.2		1.7	1.1		7.8		1.5	5.40		4.1	
			0.4					5.2					1.1	
			1.0					7.4					4.0	
0.86	0.80	0.88	0.4	1.0	1.0	2.0	3.8	1.2	0.9	1.1	2.1	3.6	9.6	2.45
0.56	0.50		1.2		2.6	0.8		3.0		2.1	0.6		1.4	
			1.0					7.1					6.8	
			1.1					3.7					1.2	
x	0.91	1.17	1.23	1.17	0.97	1.78	4.6	5.69	2.9	2.01	2.19	4.73	4.85	2.95
SD	0.51	0.61	0.85	0.54	0.54	0.79	2.31	2.15	1.76	2.42	1.78	2.14	2.75	0.68

auf die Überlebensrate der Zellen oder den PWM-induzierten ^3H -Tdr-Einbau.

Das weist darauf hin, daß von dysgammaglobulinämischen Lymphozyten keine supprimierende Wirkung auf die Zellen oder die Stimulierung von normogammaglobulinämischen Zellen ausgeht.

Zur Überprüfung des Systems wurden Kombinationen nicht histokompatibler Tiere (Typisierung erfolgte mit gegen den MHC-Haupthistokompatibilitäts-Komplex gerichtete Antiseren bei Herrn Dr.K.Hala in Innsbruck; die Tiere zeigten Unterschiede in einem oder 2 Markern) untersucht. Wie hier an einem Versuchsbeispiel gezeigt wird (Tab.34) weisen die Kombinationskulturen in Abhängigkeit ihrer Markerunterschiede veränderte Stimulierbarkeit mit PWM auf. Die Lymphozyten des dysgammaglobulinämischen UM-B19 Huhns (aB)⁻ erkannten den Zusatzmarker (c) nicht. Ohne Mitogen erhöhte sich der ^3H -Tdr-Einbau nicht.

Kokultur von Lymphozyten mit über Nylonwolle gewonnenen T-Zellen im Verhältnis 1:1 ergab, nach Stimulation mit PWM (15 $\mu\text{l/ml}$) bei NO mit autologen oder T-Zellen anderer NO-Tiere eine signifikante Verminderung der Stimulation (Tab.35). DYS-Lymphozyten antworteten in Kombination mit eigenen oder anderen DYS-T-Zellen nicht signifikant unterschiedlich zu allein kultivierten Lymphozyten (Tab.36). NO-Lymphozyten zeigten in Kombination mit DYS-T-Zellen keine verminderte Stimulation, während DYS-Lymphozyten mit NO-T-Zellen leicht erhöhte Proliferationsraten aufwiesen (Tab.35; Tab.36).

Tab.34 : ^3H -Tdr-Einbau (cpm) und Stimulationsindices (Si)
PWM-stimulierter (20 $\mu\text{l/ml}$) Hnnerlymphozyten
nach Kokultivierung

B = exprimierter B-Locus (typisiert mit Antiseren)

a, c : Einzeldifferenzen im Oberflächenmuster

() $^\pm$: Tiere mit (+) oder ohne (-) IgG im Serum

Kombinationen	cpm	Si
T1 (Bac) $^-$	2334	2.31
T2 (Bac) $^-$	10651	5.96
T3 (Bac) $^+$	3789	2.44
T4 (B) $^+$	9653	5.15
T5 (Ba) $^-$	4336	2.14
T1 + T2	6653	4.19
T1 + T3	3657	2.80
T1 + T4	56497	38.67
T1 + T5	3205	2.02
T2 + T3	11901	7.28
T2 + T4	79931	46.93
T2 + T5	8291	4.76
T3 + T4	30659	18.41
T3 + T5	3495	1.86
T4 + T5	5892	3.66

Tab.35 : Stimulationsindices (Si) von PWM-stimulierten (15 μ l/ml)
NO-Lymphozyten in Kokultur mit T-Zellen verschie-
dener Herkunft

Tiere	Zellkombinationen				
	NO	NO + aut. T	NO + T-NO	NO + T-DYS ¹	
1	36.16	11.08	15.39	15.39	28.62 27.06
2	15.45		4.09	4.81	11.71 14.39
3	21.18		6.19	5.65	18.27 19.83
4	15.10		2.48	10.21	16.80 13.11
5	17.64		8.46	12.63	10.88 13.79
6	24.05		14.56	17.27	19.40 22.94
$\bar{x}$	21.60 ^a		7.81 ^b	10.99 ^b	18.07 ^a
$\pm$ SD	7.92		4.51	5.07	5.81

a, b signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

1) T-Zellen von 2 DYS-Kulturen

Tab.36 : Stimulationsindices (Si) von PWM-stimulierten (15 μ l/ml)
DYS-Lymphozyten in Kokultur mit T-Zellen verschie-
dener Herkunft

Tiere	Zellkombinationen			
	DYS	DYS + aut.T	DYS + T-DYS	DYS + T-KO ¹⁾
1	2.96	4.67	3.46	8.27 6.65
2	21.09	19.36	18.57	28.89 27.32
3	18.17	15.96	15.44	23.11 29.04
4	15.03	17.51	16.02	19.98 26.17
5	32.60	29.43	34.63	35.35 38.00
6	24.35	20.41	24.07	32.94 26.29
$\bar{x}$	19.03	17.89	18.07	25.13
$\pm$ SD	9.92	8.00	10.32	9.61

1) T-Zellen von 2 KO-Kulturen

4.2.4. Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf den ^3H -Tdr-Einbau von PWM-stimulierten Lymphozyten

Bei den vergleichenden Untersuchungen an DYS- und NO-UM-B19 und nicht B-typisierten KO-Hühnern bezüglich der Proliferation mitogen stimulierter Lymphozyten wurden Unterschiede zwischen den drei Tierpopulationen festgestellt (Abb.6; Abb.7). Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede allein auf der mitogenen Antwort mit PWM und ConA beruhen, oder ob zelluläre Produkte, die während der Kultivierung entstehen, die jeweiligen Proliferationsraten deutlich beeinflussen, wurden unterschiedliche Fütterung (Austauschfütterung und Konzentratfütterung an Tag 3 der Kultivierung) und die Wirkung von Medium (F-Med) und Kulturüberständen (aut-Med; DYS-Med; KO-Med) auf den ^3H -Tdr-Einbau nach 6-tägiger Stimulierung mit PWM (15 $\mu\text{l/ml}$) untersucht.

Kontroll- und dysgammaglobulinämische Lymphozyten ohne Mitogen zeigten keinerlei Unterschiede im Einbau von ^3H -Tdr, weder bei unterschiedlicher Fütterung noch bei variierenden Überständen.

Mit PWM lag die Proliferationsrate der Zellen beider Tiergruppen nach Austauschfütterung meistens höher als nach Konzentratfütterung (Abb.8; Abb.9; Tab.37; Tab.38; Tab.39; Tab.40). Die gleichen Verhältnisse zeigten sich in allen Überstandskombinationen. Auch hier waren die Werte nach Austauschfütterung höher als nach Konzentratfütterung (Tab.37; Tab.38; Tab.39; Tab.40), wobei DYS-Lymphozyten einen deutlicheren Unterschied zwischen den zwei Fütterungsarten zeigten. Bei Zugabe von F-Med oder

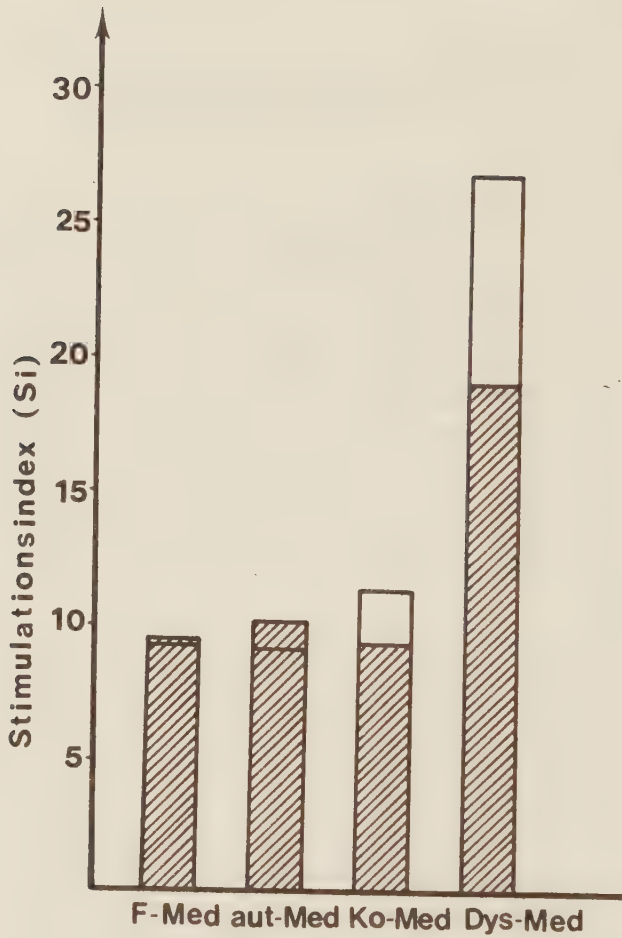


Abb.8 : Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf die Stimulationswerte PWM-stimulierter (15 μ l/ml) KO-Lymphozyten nach verschiedenen Fütterungen an Tag 3

 Konzentratfütterung
 Austauschfütterung

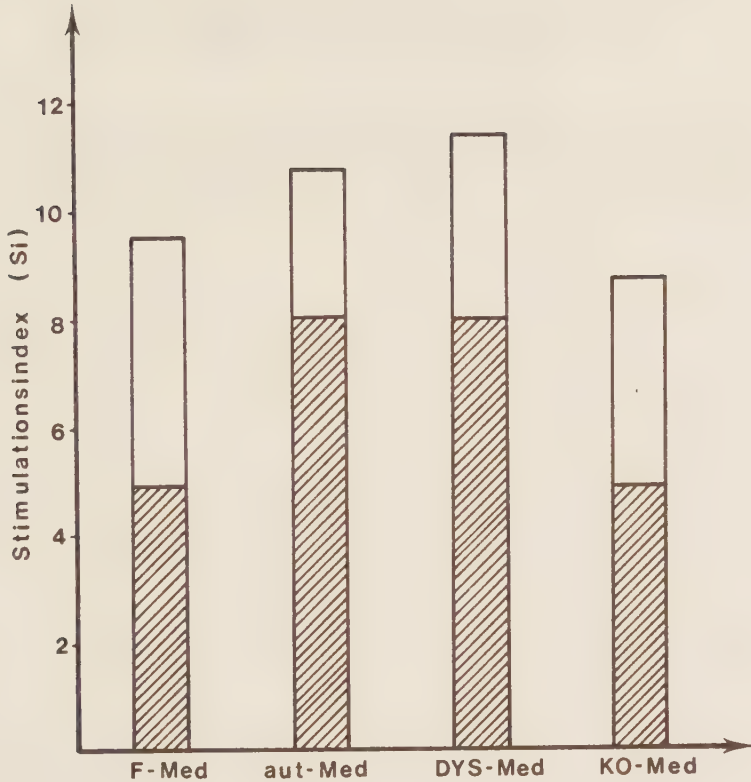


Abb.9 : Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf die Stimulationswerte PWM-stimulierter (15 μ l/ml) DYS-Lymphozyten nach verschiedenen Fütterungen an Tag 3

 Konzentratfütterung
 Austauschfütterung

Tab.37 : Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf
die Stimulationswerte PWM-stimulierter (15 µl/ml)
KO-Lymphozyten bei Konzentratfütterung an Tag 3

Tier Nr.	F-Med	aut-Med	KO-Med	DYS-Med ¹⁾
1	6.68	6.51	3.59	15.69 7.29
2	9.45	7.31	17.10	40.17 42.54
3	11.31	10.80	11.47	21.01 21.35
4	5.49	13.91	5.90	15.00 17.06
5	11.00	11.24	11.37	21.03 10.76
6	4.61	1.86	5.52	7.20 5.57
7	17.13	19.07	10.13	24.29 18.03
$\bar{x}$	9.38 ^a	10.10 ^{ac}	9.30 ^a	19.07 ^{bc}
±SD	4.31	5.56	4.64	11.09

a,b,c, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

1) Überstände von 2 DYS-Kulturen

Tab.38 : Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf die Stimulationswerte PWM-stimulierter (15 μ l/ml) KO-Lymphozyten bei Austauschfütterung an Tag 3

Tier Nr.	F-Med	aut-Med	KO-Med	DYS-Med ¹⁾
1	27.00	27.63	17.53	49.73 72.81
2	15.99	6.44	14.95	28.65 60.10
3	2.40	1.10	1.15	22.78 12.10
4	5.95	3.35	15.92	15.53 10.74
5	2.65	6.70	6.49	18.99 18.87
6	3.29	3.90	1.95	2.63 3.31
7	8.24	14.78	21.22	23.47 27.78
8	9.31	8.74	11.42	32.41 29.71
$\bar{x}$	9.35 ^a	9.08 ^a	11.33 ^a	26.85 ^b
$\pm$ SD	8.43	8.56	7.42	19.47

a,b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

1) Überstände von 2 DYS-Kulturen

Tab.39 : Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf
die Stimulationswerte PWM-stimulierter (15 µl/ml)
DYS-Lymphozyten bei Konzentratfütterung an Tag 3

Tier Nr. ¹⁾	F-Med	aut-Med	DYS-Med	KO-Med ¹⁾
1	2.08	2.25	5.93	0.50 2.36
2	15.80	23.94	26.10	17.16 4.59
3	6.31	17.49	4.39	3.90 14.49
4	1.09	0.70	4.03	1.14 2.57
5	3.92	5.66	4.87	4.82 6.04
6	3.36	1.61	3.60	1.04 0.60
7	1.39	1.94	1.89	3.47 1.65
8	5.45	10.82	13.30	8.30 5.16
$\bar{x}$	4.92 ^a	8.05 ^a	8.01 ^a	4.86 ^a
$\pm$ SD	4.78	8.63	8.06	4.81

1) Überstände von 2 KO-Kulturen

Tab.40 : Wirkung von Medium und Kulturüberständen auf
die Stimulationswerte PWM-stimulierter (15 μ l/ml)
DYS-Lymphozyten bei Austauschfütterung an Tag 3

Tier Nr,	F-Med	aut-Med	DYS-Med	KO-Med ¹⁾
1	15.55	6.30	1.92	6.82 1.72
2	15.69	33.45	33.14	38.95 29.25
3	2.14	1.88	1.20	3.63 1.71
4	3.07	2.92	9.32	5.64 2.10
5	9.35	9.45	2.58	3.01 8.65
6	8.02	7.86	14.17	11.32 10.04
7	11.70	11.50	12.21	11.40 11.04
8	10.63	12.70	16.67	9.48 5.30
$\bar{x}$	9.52 ^a	10.76 ^a	11.40 ^a	8.75 ^a
$\pm$ SD	5.05	9.92	10.56	8.80

1) Überstände von 2 KO-Kulturen

KO-Med war dieser Unterschied signifikant.

Die Resuspendierung der Lymphozyten an Tag 6 in frischem Medium (F-Med) zeigte im Gegensatz zu autologem Medium (aut-Med) keinen deutlichen Unterschied, somit werden die stimulierten Zellen durch ein erneutes Nahrungsangebot nicht zu erhöhter Proliferation angeregt (Abb.8; Abb.9).

DYS-Lymphozyten zeigten keine signifikant unterschiedliche Stimulierbarkeit nachdem sie entweder in aut-Med, homologem DYS-Med oder KO-Med kultiviert wurden. In Kombination mit KO-Überständen verringert sich die Stimulierbarkeit der DYS-Zellen leicht (Abb.9).

PWM-stimulierte KO-Lymphozyten aber zeigten in Kombination mit DYS-Med einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate (Abb.8; Tab.37; Tab.38).

4.3. Purin- und Pteridinstoffwechsel

4.3.1. Analytische Bedingungen

Die Techniken, die zur analytischen Bestimmung von Purinen und Pyrimidinen sowie der Enzymaktivitäten ihres Stoffwechsels in biologischen Materialien entwickelt wurden, umfassen

- a. Enzymbestimmungen: photometerisch oder durch radiochemische Messung über Papierelektrophorese oder Ionen-Austausch-Papierchromatographie (Siegenbeek van Heukelom et al.1976; Webster et al.1978; Bismuth et al.1982)
- b. Ionen-Austausch-Chromatographie (Schmalstieg et al.1977; Webster et al.1978)
- c. Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in die Ribonucleotide der Zellen (Nishida et al.1980)
- d. Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv markierten Ausgangssubstanzen (Snyder and Henderson 1973; Henderson et al.1974).

Mit der Ionen-Austausch-Chromatographie war es zum ersten Mal möglich, unterschiedliche Metabolite in biologischen Flüssigkeiten zu bestimmen. Es waren aber hauptsächlich zwei Probleme, die diese Methode für die Bestimmung von Purin- und Pyrimidinverbindungen in biologischen Proben wenig geeignet machte: die zum Teil sehr geringen Konzentrationen der Verbindungen und die große Anzahl von begleitenden Substanzen mit ähnlichen chromatographischen Eigenschaften. Erst die leistungsfähigere Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit sensiblen UV-Detektoren ermöglichte die Bestimmung von Nucleinsäu-

remetaboliten mit ausreichender Sensitivität und Spezifität (Brown et al.1974).

Die Trennleistung des Systems zeigt das Chromatogramm eines 6-Tage-Überstandes von KO-Lymphozyten ohne PWM (Abb.10). Neben den Hauptpeaks erschienen zusätzlich gut getrennte Peaks von Substanzen, die entweder nur geringe UV-Absorption besitzen oder nur in geringen Konzentrationen vorkommen. Die Analysenzeit mit etwa 15 Minuten ist relativ kurz. Eine Aufbereitung der Proben vor der HPLC-Analyse ist nicht notwendig. Es hat sich jedoch gezeigt, daß eine Entfernung der Proteine durch Fällung mit Perchlorsäure eine frühzeitige Kontamination des Säulenmaterials verhindert.

Die Zuordnung der Peaks zu den verschiedenen Nucleinsäuremetaboliten erfolgte über verschiedene Methoden:

1. Zulage von Standardsubstanzen, die zu einer Erhöhung des entsprechenden Peaks führt
2. Veränderung der Retentionszeit durch Änderung des pH-Wertes des Elutionsmittels, was besonders bei Harnsäure und den Nucleotiden zu beobachten war
3. Messung des Verhältnisses der Absorption bei 254 und 280 nm, das charakteristisch für viele Verbindungen ist (Baker et al.1979)
4. Zugabe von spezifischen Enzymen, wobei der Peak des Edukts im Chromatogramm verschwindet und der Peak des entsprechenden Produktes erscheint.

Die Quantifizierung erfolgte über den Vergleich der Peakflächen mit Standardlösungen der identifizierten Purine und Pyrimidine.

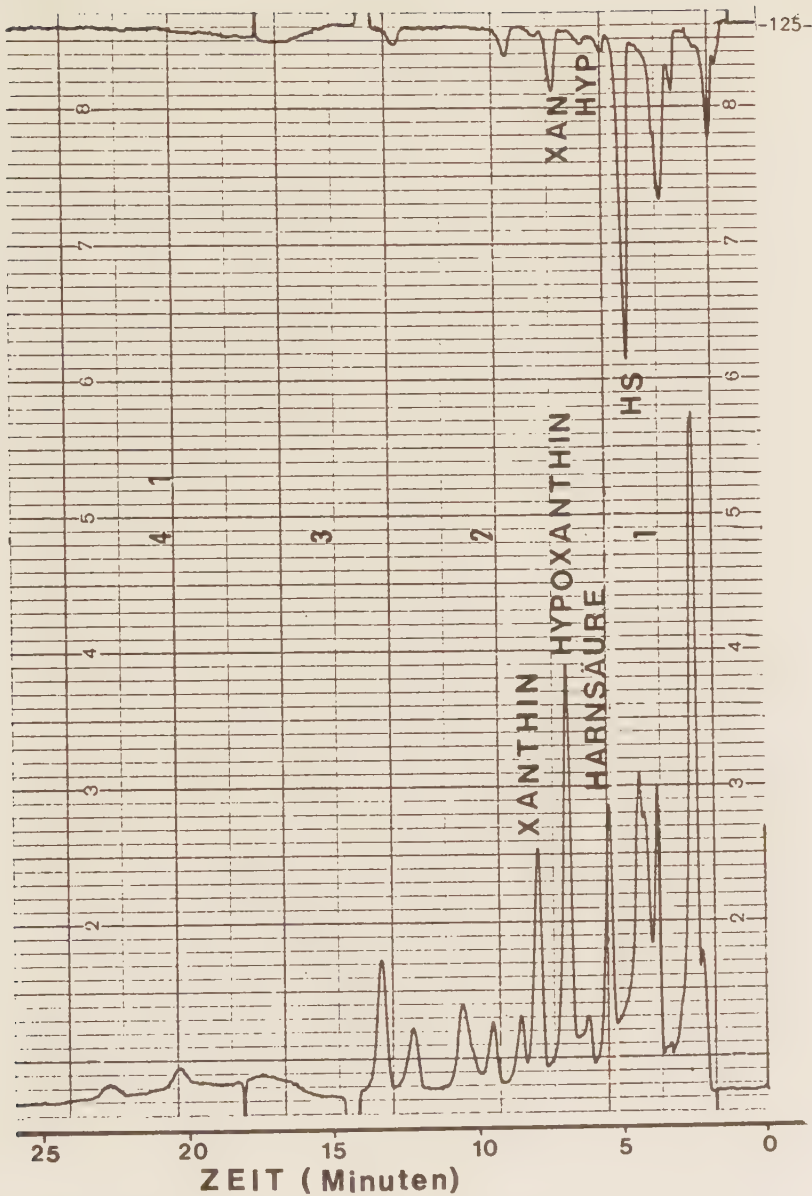


Abb.10 : HPLC-Chromatogramm eines 6-Tage Überstandes
von KO-Lymphozyten

Säule: Spherisorb ODS II 5 μm

Elutionsmittel: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 5.1

Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min.

Detektion bei 254 nm (unteres Chromatogramm)

280 nm (oberes Chromatogramm)

4.3.2. Purin- und Pyrimidingehalt in aviären Blutlymphozyten und 6-Tage-Überständen

Ausgangspunkt dieser Untersuchung war der Befund, daß bei Zugabe von 6-Tage Überständen von stimulierten (PWM 15µl/ml) Lymphozyten dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner der Stimulationsindex von KO-Lymphozyten innerhalb von 18 Stunden um ca. 20 - 30% erhöht wird (Abb.8). Dieser positive Effekt ist möglicherweise die Folge von Stoffwechselprodukten oder aktivierenden Faktoren, die von UM-B19 Zellen freigesetzt werden.

Versuche diesen "zellulären Faktor" mit Hilfe der Membranfiltration abzutrennen und weiter zu identifizieren waren erfolglos. Sowohl das nach Filtration erhaltene Eluat als auch die von der Oberfläche der Membran durch Resuspendieren rückgewonnenen Produkte zeigten keine eindeutige Wirkung auf den ^3H -Tdr-Einbau von PWM-stimulierten Lymphozyten.

Anschließende Untersuchungen an frisch gewonnenen Zellen (siehe 3.5.1.) und 6-Tage Überständen von stimulierten und unstimulierten Hühnerlymphozyten mit Hilfe der HPLC zeigten deutliche Unterschiede im Purin- und Pyrimidingehalt. Im HPLC-Chromatogramm konnten 4 Peaks identifiziert werden: Harnsäure (Hs), Hypoxanthin (Hyp), Xanthin (Xan) und Uridin (Urd).

Sowohl in Lymphozyten von Kontrollen, als auch von NO- und DYS-Hühnern konnte keine Harnsäure, das Endprodukt des Purinstoffwechsels, nachgewiesen werden. Der Xanthinspiegel war in den Zellen der drei Tiergruppen sehr gering ($< 0.01 \mu\text{g}/10^7$ Zellen). DYS-Lymphozyten enthielten aber circa 30 % weniger

Hypoxanthin und signifikant mehr Uridin als KO- und NO-Lymphozyten (Abb.11; Tab.41).

Untersuchungen an 6-Tage Überständen von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Zellen zeigten, daß in den Überständen beider Tiergruppen Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin aber kein Uridin vorhanden ist. Bei der Berechnung der Konzentrationen der Purinmetabolite in Überständen wurden die im Kulturmedium* bereits vorhandenen Purinmengen (aus dem Hühnerserum) abgezogen. Überstände von unstimulierten DYS-Zellen enthielten signifikant ($p < 0.05$) weniger Hypoxanthin und Xanthin aber signifikant mehr Harnsäure als KO-Überstände (Tab.42; Tab.43). Stimulierung mit PWM (150 µl/10 ml) hatte bei beiden Tiergruppen eine Abnahme des Harnsäurespiegels in den Überständen zur Folge, die Verminderung war in DYS-Überständen signifikant. In KO-Überständen fiel dazu noch der Hypoxanthinspiegel ab. Die Xanthinkonzentration änderte sich durch PWM-Stimulierung bei beiden Tiergruppen nicht (Abb.11; Tab.42; Tab.43).

Auffallenderweise enthalten die 6-Tage Überstände stimulierter KO- und DYS-Lymphozyten gleiche Mengen an Harnsäure und Hypoxanthin, obwohl Zellen und Überstände unstimulierter Kulturen signifikante Konzentrationsunterschiede dieser beiden Metabolite aufweisen. Unter mitogenen Bedingungen wird der Purinstoffwechsel und damit der salvage pathway aktiviert (Peters and Veerkamp 1983), so daß wahrscheinlich Hypoxanthin bis auf ein Mindestmaß verstoffwechselt und nur in geringen Mengen in das Medium abgegeben oder durch XOD zu Harnsäure abgebaut wird.

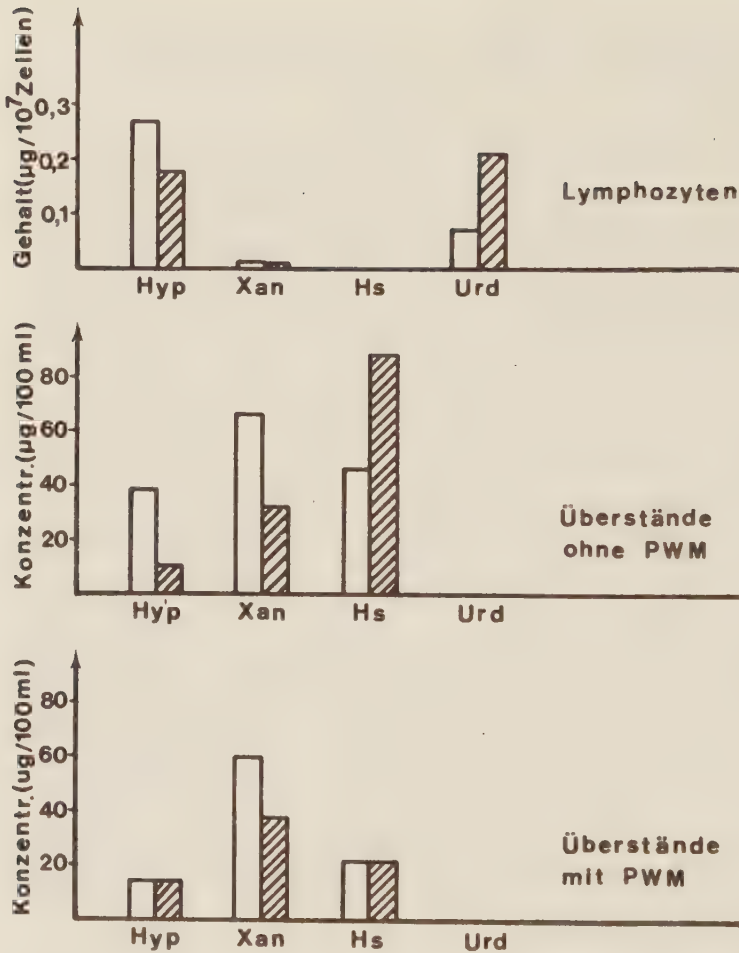


Abb.11 : Purine und Pyrimidine in Lymphozyten und 6-Tage Überständen von Kontroll- und dysgammaglobulinämischen Hühnern
 □ Kontrollhühner
 ▨ dysgammaglobulinämische Hühner
 (Hyp: Hypoxanthin; Xan: Xanthin ; Hs: Harnsäure; Urd: Uridin)

Tab.41 : Hypoxanthin (Hyp)- und Uridin (Urd)- Gehalt
($\mu\text{g}/10^7$ Zellen) in Blutlymphozyten von KO-,
NO- und DYS-Hühnern

	KO-Tiere		NO-Tiere		DYS-Tiere	
	Hyp	Urd	Hyp	Urd	Hyp	Urd
	0.178	0.016	0.246	0.180	0.150	0.144
	0.532	0.040	0.232	0.098	0.170	0.172
	0.428	0.062	0.261	0.080	0.174	0.322
	0.376	0.028	0.209	0.112	0.240	0.218
	0.246	0.110	0.294	0.074	0.162	0.243
	0.130	0.110			0.194	0.214
	0.156	0.094			0.158	0.196
	0.130	0.094				
$\bar{x}$	0.272 ^{ab}	0.069 ^c	0.248 ^{ab}	0.109 ^c	0.178 ^a	0.215 ^d
$\pm\text{SD}$	0.154	0.038	0.032	0.042	0.031	0.060

a,b,c,d, signifikant unterschiedlich
($p < 0.05$)

Tab.42 : Harnsäure (Hs)-, Hypoxanthin (Hyp)- und Xanthin (Xan)-
Konzentration (mg/100 ml) in Kulturüberständen von stimu-
lierten (15 µl PWM/ml) und unstimulierten KO-Lymphozyten

Tier Nr.	ohne PWM			mit PWM		
	Hs	Hyp	Xan	Hs	Hyp	Xan
1	0.011	0.044	0.098	0.0	0.0	0.074
2	0.0	0.080	0.128	0.0	0.080	0.128
3	0.0	0.060	0.078	0.0	0.0	0.039
4	0.074	0.013	0.051	0.0	0.0	0.030
5	0.050	0.031	0.055	0.064	0.001	0.066
6	0.051	0.024	0.048	0.022	0.011	0.038
7	0.055	0.031	0.059	0.076	0.006	0.090
8	0.025	0.023	0.022	0.016	0.017	0.024
$\bar{x}$	0.033	0.038	0.067	0.022	0.014	0.061
$\pm SD$	0.028	0.022	0.033	0.031	0.027	0.036

Tab.43 : Harnsäure (Hs)-, Hypoxanthin (Hyp)- und Xanthin (Xan)-
Konzentration (mg/100 ml) in Kulturüberständen von stimu-
lierten (15 μ l PWM/ml) und unstimulierten DYS-Lymphozyten

Tier Nr.	ohne PWM			mit PWM		
	Hs	Hyp	Xan	Hs	Hyp	Xan
1	0.011	0.030	0.077	0.0	0.017	0.050
2	0.080	0.011	0.027	0.004	0.0	0.010
3	0.078	0.003	0.048	0.0	0.079	0.075
4	0.158	0.007	0.045	0.003	0.007	0.041
5	0.105	0.006	0.017	0.060	0.0	0.025
6	0.102	0.0	0.031	0.0	0.0	0.043
7	0.120	0.019	0.0	0.054	0.013	0.052
8	0.117	0.013	0.017	0.067	0.005	0.010
$\bar{x}$	0.096	0.011	0.033	0.023	0.015	0.038
$\pm$ SD	0.042	0.010	0.023	0.031	0.026	0.022

4.3.3. Puringehalt in Hühnerplasma

Die Bestimmung der Purine im Hühnerplasma beschränkte sich auf diejenigen Metabolite, bei denen unterschiedliche Konzentrationen in Zellen und Überständen gefunden worden waren. Es zeigte sich, daß auch im Plasma von DYS-Hühnern Hypoxanthin und Xanthin signifikant erniedrigt vorliegen. Der Harnsäurespiegel dagegen war in beiden Tiergruppen gleich hoch (Tab.44; Tab.45).

Die Ergebnisse aus Zellen, Überständen und Plasma sprechen für einen veränderten Purinstoffwechsel bei dysgammaglobulinämischen Hühnern. Lymphozyten von NO-Hühnern dagegen enthalten die Purinmetabolite in ähnlicher Konzentration wie die Zellen von KO-Hühnern. Die verminderte Hypoxanthinkonzentration in Zellen und 6-Tage Überständen von DYS-Tieren deuten entweder auf einen verminderten Purinstoffwechsel (z.B. ADA, 5'-Nucleotidase oder Purinnucleosid-Phosphorylase gestört), auf erhöhten salvage pathway (HGPRTase erhöht) oder auf einen gesteigerten Abbau durch XOD oder XDH hin. Die Tatsache, daß DYS-Überstände ohne PWM neben einer Verminderung der Hypoxanthin- und Xanthinkonzentration erhöhte Harnsäurespiegel aufweisen, spricht für eine erhöhte Xanthinoxidaseaktivität.

4.3.4. Einfluß von Hypoxanthin auf die Stimulierung von Lymphozyten mit PWM

Beobachtungen am Immunsystem von Lesch-Nyhan Patienten gaben Hinweise, daß exogene Purine für die Lymphozytenproliferation

Tab.44 : Harnsäure (Hs)-, Hypoxanthin (Hyp)- und Xanthin (Xan)- Gehalt (mg/100 ml) in Plasma von KO-Hühnern

Tier Nr.	Hs	Hyp	Xan
1	5.79	0.137	0.118
2	5.13	0.128	0.067
3	2.90	0.081	0.035
4	2.82	0.086	0.027
5	4.77	0.097	0.044
6	4.43	0.095	0.082
$\bar{x}$	4.31	0.104	0.062
$\pm SD$	1.21	0.023	0.034

Tab.45 : Harnsäure (Hs)-, Hypoxanthin (Hyp)- und Xanthin (Xan)- Gehalt (mg/100 ml) in Plasma von DYS-Hühnern

Tier Nr.	Hs	Hyp	Xan
1	4.72	0.052	0.036
2	5.19	0.027	0.023
3	4.66	0.030	0.012
4	4.94	0.022	0.017
5	4.08	0.027	0.031
6	4.93	0.058	0.030
$\bar{x}$	4.59	0.036	0.025
$\pm SD$	0.49	0.015	0.009

nicht absolut notwendig, aber für die Funktion der B-Zellen hilfreich sind (Allison et al.1977). Exogene Purine können die Antwort sowohl von menschlichen als auch von Mäuselymphozyten auf Mitogene und Antigene modifizieren (Hovi et al.1977). Da DYS-Lymphozyten im Vergleich zu KO-Lymphozyten deutlich weniger Hypoxanthin enthalten, Hypoxanthin aber als Ausgangspunkt für den salvage pathway eine zentrale Rolle im Purinstoffwechsel spielt, wurde den Kulturen an Tag 0 und/oder Tag 6 Hypoxanthin (10 µg/10ml) zugesetzt, um den Einfluß des salvage pathways auf die Stimulierung (PWM 150 µl/10ml) und auf den ^3H -Tdr-Einbau zu bestimmen.

Zugabe von Hypoxanthin an Tag 0 und/oder Tag 6 hatte auf die Stimulationsindices von KO- und DYS-Lymphozyten keinen Einfluß (Tab.46). Hypoxanthin allein erwies sich als nicht mitogen. Dies spricht dafür, daß die mitogene Stimulierung von Hühnerlymphozyten durch exogenes Hypoxanthin nicht beeinflußt wird.

4.3.5. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Hypoxanthin, Adenin und Glycin in PWM-stimulierte Lymphozyten

Normale Lymphozyten inkorporieren exogenes Adenin, Hypoxanthin und Glycin in ihre Purinnucleotide (Hovi et al.1977). Während des Prozesses der mitogenen Aktivierung konnte eine Zunahme der Adenin- und Adenosin-Aufnahme sowie eine Zunahme der Purin de novo Synthese in kultivierten Lymphozyten gezeigt werden (Snyder et al.1976). Die Erhöhung des Purinstoffwechsels nach mitogener Stimulation ist möglicherweise einer der Mechanismen, durch den die DNA-Synthese initiiert wird (Müller et al.1980).

Tab.46 : Stimulationsindex (Si) nach Zugabe (+) von Hypoxanthin (Hyp 10 µg/10 ml) an Tag 0 und/oder Tag 6 zu stimulierten (150 µl PWM/10 ml) und unstimulierten KO- und DYS-Lymphozyten

	Hyp	PWM	Si ($\bar{x} \pm SD$)	
			KO	DYS
Ansatz Tag 0	-	+	7.25 $\pm$ 2.09 (n=12)	9.72 $\pm$ 5.93 (n=8)
	+	+	8.69 $\pm$ 5.70 (n=12)	10.72 $\pm$ 9.21 (n=8)
	+	-	0.76 $\pm$ 0.21 (n=11)	1.13 $\pm$ 0.49 (n=7)
	-	+	7.22 $\pm$ 3.70 (n=11)	10.37 $\pm$ 7.27 (n=8)
zusätzliche Hyp-Zugabe an Tag 6	+	+	9.41 $\pm$ 4.50 (n=11)	10.31 $\pm$ 10.28 (n=8)
	+	-	1.42 $\pm$ 0.72 (n=11)	1.38 $\pm$ 0.50 (n=7)

Zur Überprüfung des salvage pathways (Hypoxanthin), der de novo Purinsynthese (Glycin), sowie eines möglichen Defektes der ADA (Adenin) wurde die Einbaurate der verschiedenen Metabolite in Hühnerlymphozyten überprüft. Die Aufnahme der markierten Vorstufen über 8 Stunden in 6 Tage mit PWM (150 μ l/10 ml) stimulierten Lymphozyten zeigen Abb.12; Tab.47; Tab.48. Der Stimulationsindex von Thymidin lag bei beiden Tiergruppen signifikant höher als der von Hypoxanthin, Adenin und Glycin. Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, daß Thymidin eine wesentlich geringere Zahl von Stoffwechselschritten bis zum Einbau in die DNA benötigt. Die Einbauraten von Hypoxanthin, Adenin und Glycin in Lymphozyten von KO-Tieren war annähernd gleich. Die Aufnahme von Hypoxanthin in DYS-Lymphozyten war höher als bei KO, aber der Unterschied war nicht signifikant. Bezüglich Adenin- und Glycineinbau konnte kein Unterschied festgestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, daß bei der mitogenen Stimulation aviärer Lymphozyten sowohl die Purin de novo Synthese als auch der salvage pathway erhöht ist.

Es ist jedoch zu bedenken, daß die Aufnahmerate markierter Purinvorstufen sowohl die Rate des Zellmembrantransportes, des intrazellulären Metabolitenpools als auch die intrazelluläre Verwertung für die makromolekulare Synthese (DNA und RNA) reflektiert.

4.3.6. Stoffwechsel von Hypoxanthin in Hühnerlymphozyten

Untersuchungen zum Purinstoffwechsel sind mit großen methodischen Schwierigkeiten verbunden. Erstens sind mehr als 20 Enzyme an diesem Stoffwechsel beteiligt, von denen einige sehr schwierig

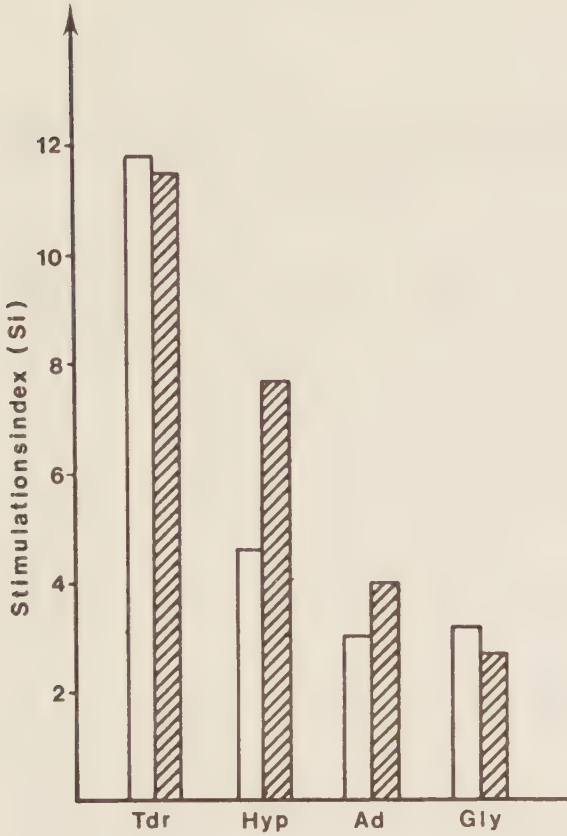


Abb.12 : Stimulationsindices (SI) nach PWM-Stimulation (15 μ l/ml) von KO- und DYS-Lymphozyten bei Markierung mit verschiedenen Metaboliten des Nucleinsäurestoffwechsels



Kontrollhühner



dysgammaglobulinämische Hühner

(Tdr: Thymidin; Hyp: Hypoxanthin; Ad: Adenin; Gly: Glycin)

Tab.47 : Stimulationsindices (Si) nach PWM-Stimulation (15µl/ml)
von KO-Lymphozyten bei Markierung mit verschiedenen
Metaboliten des Nucleinsäurestoffwechsels.

Tier Nr.	Tdr	Hyp	Ad	Gly
1	8.54	5.19	4.46	
2	6.37	1.95	1.45	
3	13.36	10.96	5.67	
4	4.78	4.48	3.03	
5	5.35		3.40	1.76
6	1.48		1.30	1.61
7	23.19		1.61	3.30
8	23.80		2.04	7.29
9	11.18			1.40
10	21.68			3.69
11	7.14	1.82	3.87	
12	15.15	3.23	3.61	
$\bar{x}$	11.83	4.60	3.04	3.17
$\pm SD$	7.65	3.39	1.44	2.23

Tab.48 : Stimulationsindex (Si) nach PWM-Stimulation (15µl/ml)
von DYS-Lymphozyten bei Markierung mit verschiedenen
Metaboliten des Nucleinsäurestoffwechsels

Tier Nr.	Tdr	Hyp	Ad	Gly
1	9.96	13.47	6.47	
2	15.01	12.78	5.29	
3	7.12	1.95	3.97	
4	14.74	3.20	3.53	
5	7.74		2.42	3.65
6	3.39		1.27	1.65
7	14.68		1.81	1.00
8	21.67		6.94	4.65
9	9.72			1.52
10	16.26			3.77
11	13.13	10.80	5.72	
12	4.16	4.38	2.79	
x	11.46	7.76	4.02	2.71
±SD	5.39	5.16	1.99	1.50

zu untersuchen sind , und außerdem ist die benötigte Gesamtmenge an Untersuchungsmaterial für alle Enzyme höher als man oft von einem Versuchstier bekommen kann.

Wegen dieser Schwierigkeiten und dem an DYS-Tieren begrenzten Tiermaterial wurde ein in vitro System mit intakten Hühnerlymphozyten herangezogen, das die größtmögliche Information über den Purinstoffwechsel verspricht und nur geringe Blutmengen benötigt. Dabei wurde nach 1 stündiger Inkubation der Blutlymphozyten mit ^3H -Hypoxanthin die markierten Metabolite nicht wie in der Literatur über Dünnschichtchromatographie (Henderson et al.1974) getrennt, sondern ein schnelles Trennverfahren mittels HPLC verwendet.

Zur Auftrennung der verschiedenen Metabolite wurden neue Bedingungen für die HPLC an Hand von Standardsubstanzen erarbeitet. Besondere Schwierigkeiten bereiteten die Auftrennung der Monophosphate sowie die hohen Retentionszeiten der Nucleoside. Nach Erhöhung der theoretischen Bödenzahl durch Verwendung zweier hintereinander geschalteter Säulen, wurde ein Teil des Trennproblems gelöst. Erniedrigung des pH-Wertes von 4.8 auf 3.6 hatte die Trennung von AMP/Hyp/Gua zur Folge. Um die GMP/IMP-Trennung zu erhalten, wurde die Analyse mit einem Puffer pH 4.8 gestartet. Die unter den üblichen Bedingungen sehr hohen Retentionszeiten der Nucleoside konnten durch erneute Änderung des Eluenten auf einen Puffer mit 30% Methanol auf eine Laufzeit von circa 45 Minuten herabgesetzt werden. Ein Chromatogramm zeigt Abb.13.

Zur Bestimmung der einzelnen Metabolite wurde den Proben ein

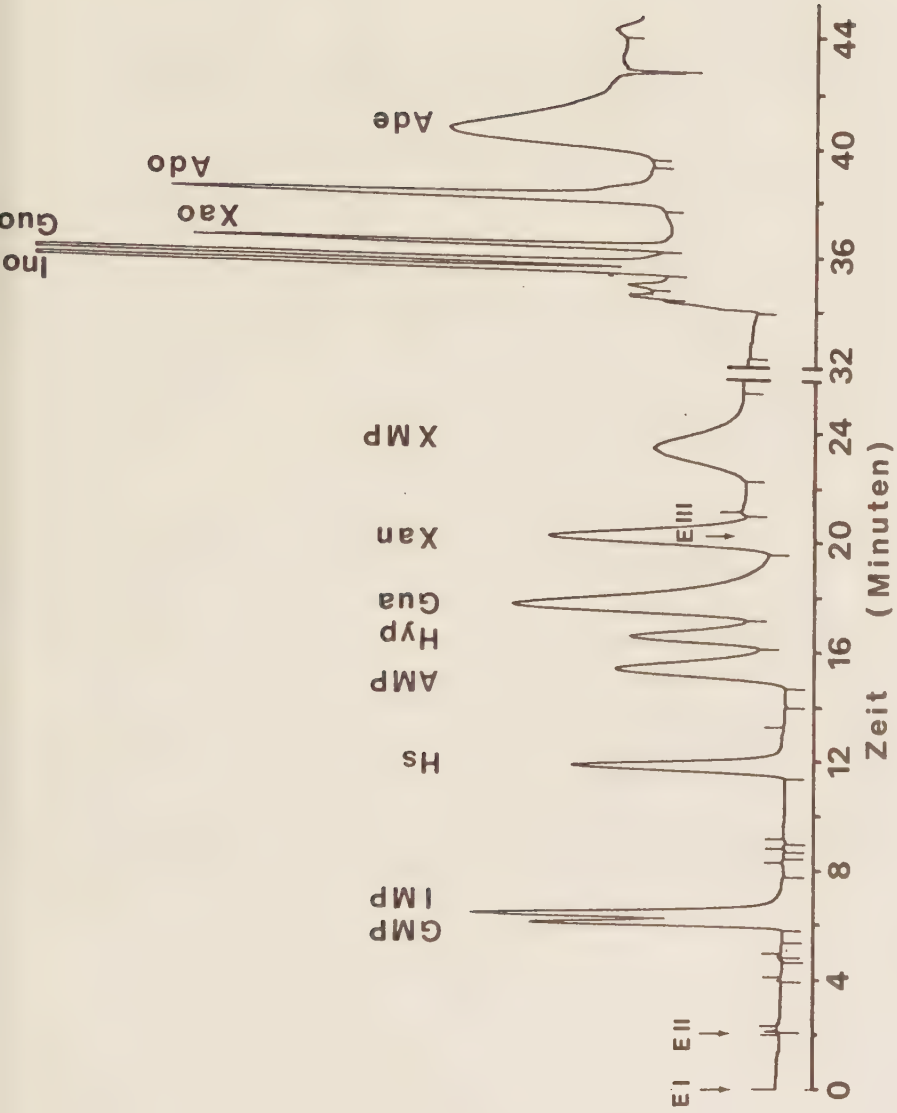


Abb.13 : Legende siehe nächste Seite

Abb.13 : HPLC-Chromatogramm der verschiedenen Metabolite des Hypoxanthinstoffwechsels

Säulen: Spherisorb ODS II, 5 μ m (300x4 mm)

μ Bondapak C18

Elutionsmittel : I: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 4.8

II: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 3.6

III: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 30% Methanol

Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min

Detektion : 254 nm

Abkürzungen:

GMP : Guanosinmonophosphat

IMP : Inosinmonophosphat

Hs : Harnsäure

AMP : Adenosinmonophosphat

Hyp : Hypoxanthin

Gua : Guanin

Xan : Xanthin

XMP : Xanthosinmonophosphat

Ino : Inosin

Guo : Guanosin

Xao : Xanthosin

Ado : Adenosin

Ade : Adenin

Standardgemisch der Substanzen zugegeben, um eine Detektion und Fraktionierung sicherzustellen.

Die Reaktionen des Purinstoffwechsels gemessen an Hand der Umsetzung von radioaktiv markiertem Hypoxanthin zeigt Abb.14 (nach Henderson et al.1974).

Die Aktivität jeder enzymatischen Reaktion spiegelt sich in der metabolisierten Substratmenge wider. Aus der Summation der Radioaktivitäten aller Metabolite distal zur fraglichen Enzymreaktion wurde die Aktivität der Enzyme nach Henderson et al.1974 berechnet.

Die Tabellen 49 und 50 zeigen die apparenten Enzymaktivitäten des Purinstoffwechsels von Hühnerlymphozyten bei Inkubation mit radioaktivem Hypoxanthin. Bei beiden Tiergruppen war der salvage pathway (HGPRT) gegenüber dem Katabolismus (XDH) eindeutig bevorzugt. Der Anteil der Guanosinnucleotidsynthese aus IMP war bei DYS-Tieren etwa um den Faktor 7 und bei KO-Tieren etwa um den Faktor 12 höher, als die Adenosinmonophosphat-Synthese. Der Unterschied in den apparenten Enzymaktivitäten der IMP-Dephosphorylase und der Adenylosuccinat-Synthetase bei KO- und DYS-Tieren war nicht signifikant. Ebenso zeigten der Katabolismus (XDH) und der Gesamtumsatz von Hypoxanthin keinen Unterschied zwischen KO- und DYS-Tieren.

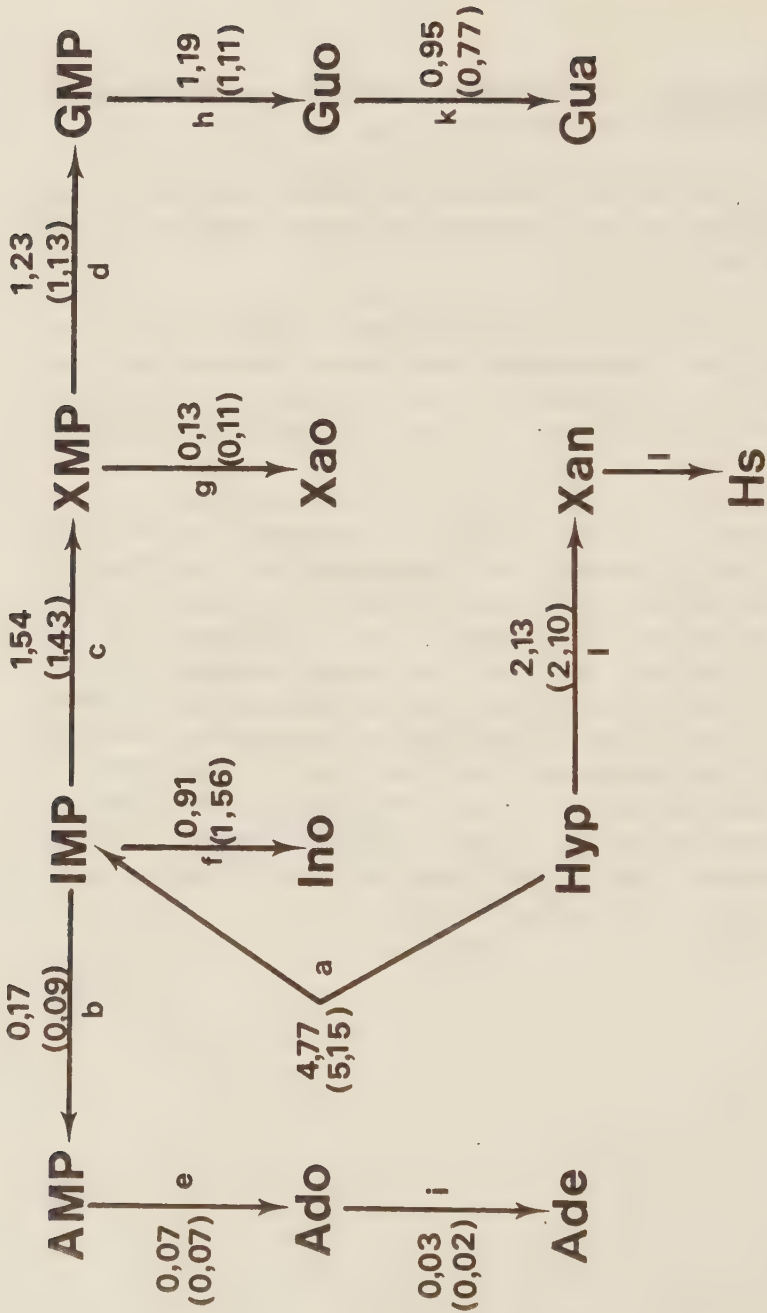


Abb.14 : Legende siehe nächste Seite

Abb.14 : Hypoxanthinstoffwechsel in Lymphozyten von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Hühnern
Die Daten in der Darstellung stellen die apparenten Enzymaktivitäten der einzelnen Enzyme (a - l) ausgedrückt in $\text{mol}/10^7$ Zellen dar
Werte von KO-Lymphozyten stehen in Klammern

Abkürzungen der Enzyme:

- a : Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
- b : Adenylosuccinat-Synthetase
- c : Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
- d : Guanosinmonophosphat-Synthetase
- e : Adenosinmonophosphat-Dephosphorylase
- f : Inosinmonophosphat-Dephosphorylase
- g : Xanthosinmonophosphat-Dephosphorylase
- h : Guanosinmonophosphat-Dephosphorylase
- i : Adenosin-Phosphorylase
- k : Guanosin-Phosphorylase
- l : Xanthinoxidase

Tab.49 : Hypoxanthinstoffwechsel in Lymphozyten von Kontrollhühnern

Die Abkürzungen für die Enzyme (a - l) sind in der Legende der Abb.14 erklärt

Tier Nr.	apparente Enzymaktivitäten ($\mu\text{mol}/1/10^7$ Zellen)										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l
1	6.52	0.07	1.17	1.06	0.06	1.36	0.10	1.04	0.02	0.89	3.88
2	3.15	0.07	1.03	0.57	0.05	0.69	0.10	0.53	0.02	0.43	1.35
3	6.72	0.07	1.47	1.02	0.05	0.41	0.11	1.01	0.02	0.88	4.76
4	5.89	0.14	1.94	1.74	0.13	3.12	0.09	1.73	0.03	0.41	0.64
5	6.66	0.13	1.29	1.14	0.11	4.67	0.07	1.13	0.02	0.40	0.78
6	3.52	0.08	1.53	1.15	0.05	0.45	0.10	1.14	0.02	1.06	1.44
7	3.69	0.06	1.46	1.14	0.04	0.68	0.07	1.11	0.02	1.03	1.46
8	5.02	0.10	1.54	1.20	0.08	1.08	0.21	1.17	0.02	1.05	2.51
$\bar{x}$	5.15	0.09	1.43	1.13	0.07	1.56	0.11	1.11	0.02	0.77	2.10
$\pm\text{SD}$	1.51	0.03	0.27	0.32	0.03	1.53	0.04	0.32	0.003	0.30	1.50

Tab.50 : Hypoxanthinstoffwechsel in Lymphozyten von dysgammaglobulinämischen Hühnern
Die Abkürzungen für die Enzyme (a - l) sind in der Legende der Abb.14
erklärt

Tier Nr.	apparente Enzymaktivitäten ($\mu\text{mol}/1/10^7$ Zellen)											
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l	
1	3.68	0.09	1.53	1.16	0.06	0.77	0.14	1.13	0.03	1.01	1.27	
2	6.66	0.12	2.37	2.12	0.07	0.64	0.23	2.10	0.03	0.95	3.53	
3	8.10	0.16	2.13	1.43	0.15	3.00	0.38	1.35	0.05	1.10	2.75	
4	4.24	0.14	1.48	1.12	0.08	0.40	0.06	1.09	0.03	1.01	2.23	
5	4.54	0.07	1.25	0.97	0.06	0.41	0.07	0.96	0.02	0.87	2.81	
6	5.23	0.07	1.27	1.03	0.06	0.74	0.09	1.01	0.02	0.92	3.14	
7	3.21	0.66	1.23	1.19	0.04	0.95	0.04	1.10	0.02	1.01	0.34	
8	2.52	0.07	1.08	0.81	0.05	0.35	0.06	0.79	0.02	0.73	1.01	
$\bar{x}$	4.77	0.17	1.54	1.23	0.07	0.91	0.13	1.19	0.03	0.95	2.13	
$\pm\text{SD}$	1.85	0.20	0.46	0.40	0.03	0.87	0.12	0.40	0.01	0.11	1.14	

4.3.7. Pteridingehalt in aviären Lymphozyten und 6-Tage Überständen

Der Nachweis von Pteridinmetaboliten ist schwierig, da sie in biologischem Material nur in pg-Mengen vorkommen, lichtempfindlich und teilweise an Proteine gebunden sind, sowie leicht oxidiert werden. Außer einem zwar spezifischen aber auf Biopterin beschränkten Nachweis mittels *Chrithidia fasciculata*, ist zur Zeit die Trennung mit quantitativer Bestimmung mittels reversed-phase HPLC die Methode der Wahl.

Die chromatographische Analyse der Pteridine in aviären Lymphozyten (1×10^7 Zellen/Probe) ergab im wässrigen Eluat I kein Isoxanthopterin, während Eluat II vier verschiedene Peaks zeigte (Abb. 15). Mit Hilfe von zwei Laufmitteln und Aufaddierung eines externen Standards konnte Biopterin eindeutig identifiziert werden.

Bei den anderen Peaks handelt es sich wahrscheinlich um 6-Hydroxymethylpterin und 6-Formylpterin. Die analogen Peaks wurden bei Mäuselymphozyten (ICB) inzwischen durch Abbaureaktionen eindeutig als solche identifiziert (Ziegler pers.Mitteilung). Ihre Konzentration variierte bei Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Tieren nur geringfügig. Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß Lymphozyten von Kontrolltieren signifikant (um 30 %) mehr Biopterin enthalten, als Zellen von dysgammaglobulinämischen Tieren (Abb.16; Tab.51).

Die Untersuchungen an 6-Tage kultivierten Lymphozyten und ihren Überständen erwiesen sich als sehr schwierig. Die nach Kultivierung verbleibende Zellzahl reichte oft für eine Pteridinbestimmung nicht aus.

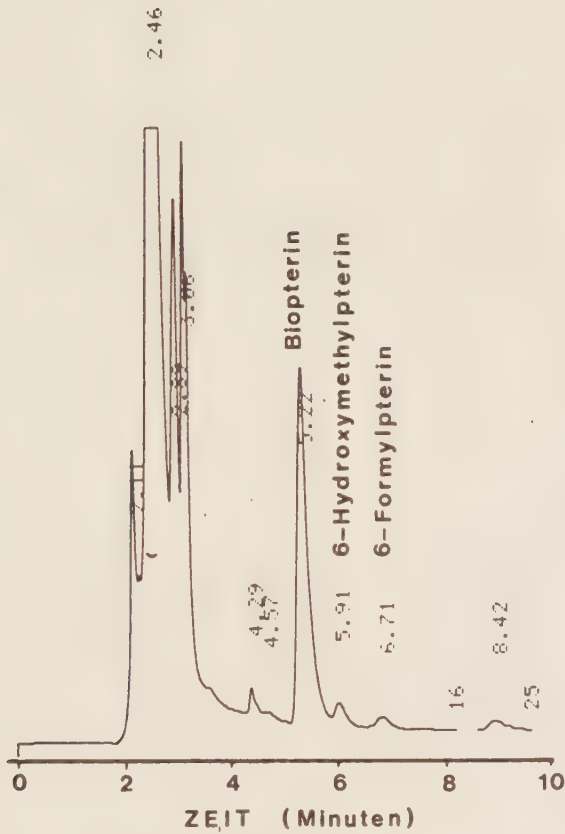


Abb.15 : HPLC-Chromatogramm (Eluat II) der Pteridine in Lymphozyten von Kontrollhühnern
Säule: Ultrasphere ODS C18 5 μ m
250x4.6 mm
Elutionsmittel: 10% Methanol
Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min
Detektion: Fluoreszenz 350 nm/ 450 nm

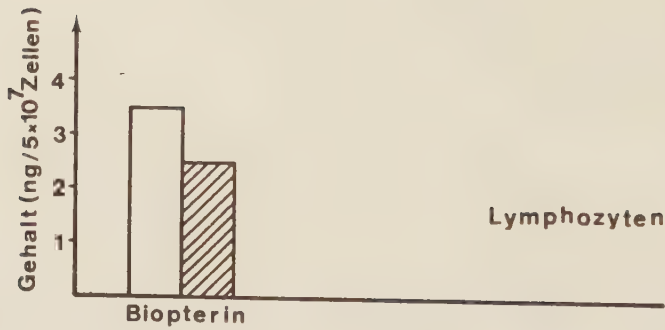


Abb.16 : Pteridine in Lymphozyten und 6-Tage
Überständen von KO- und DYS-Hühnern
□ Kontrollhühner
▨ dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.51 : Biopterin Gehalt in 5×10^7 peripheren Blutlymphozyten von KO- und DYS-Hühnern

Tier Nr.	Biopterin (pg/ 5×10^7 Zellen)	
	KO	DYS
1	3114	2156
2	3152	2136
3	3376	3265
4	2900	2805
5	5209	2363
6	2760	2242
7	3415	2899
8	3497	-
9	3949	-
$\bar{x}$	3486 ^a	2553 ^b
$\pm$ SD	735	439

a,b signifikant unterschiedlich
($P < 0.05$)

Tab.52 : Biopterin- und Isoxanthopteringehalt (ng/10 ml) in Kulturüberständen von KO-Lymphozyten mit (15 µl/ml) und ohne PWM-Stimulation

TierNr.	Biopterin		Isoxanthopterin	
	ohne PWM	mit PWM	ohne PWM	mit PWM
1	8.72	14.52	1.73	1.58
2	9.80	14.82	0.71	1.32
3	12.81	19.95	2.14	4.09
4	9.32	14.58	1.48	4.03
5	9.67	14.37	1.96	2.75
6	8.98	14.43	1.93	3.74
$\bar{x}$	9.88 ^a	15.44 ^b	1.66 ^a	2.92 ^b
±SD	1.49	2.21	0.52	1.24

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab.53 : Biopterin- und Isoxanthopteringehalt (ng/10 ml) in Kulturüberständen von DYS-Lymphozyten mit (15 µl/ml) und ohne PWM-Stimulation

Tier Nr.	Biopterin		Isoxanthopterin	
	ohne PWM	mit PWM	ohne PWM	mit PWM
1	7.31	9.23	4.46	18.95
2	6.82	9.86	6.29	17.45
3	5.02	6.25	3.98	11.43
4	7.90	10.37	4.93	14.75
5	7.11	8.84	4.32	13.25
6	6.42	9.52	5.26	15.95
$\bar{x}$	6.76 ^a	9.01 ^b	4.87 ^a	15.30 ^b
±SD	0.99	1.45	0.83	2.75

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Im Dowex-Eluat I der Überstände konnte Isoxanthopterin identifiziert werden, in Eluat II konnten wegen störender fluoreszierender Begleitstoffe aus dem Medium nur hinsichtlich Biopterin sichere Aussagen gemacht werden. Es zeigte sich, daß in Überständen von stimulierten und unstimulierten UM-B19 Zellen die Biopterinmenge im Gegensatz zu KO-Überständen vermindert war (Abb.16; Tab.52; Tab.53). PWM-Stimulation verursachte bei KO- und DYS-Zellen eine signifikante Erhöhung des Biopterin- und Isoxanthopteringehaltes im Überstand. Jedoch enthielten die Überstände stimulierter oder unstimulierter DYS-Lymphozyten stets eine signifikant höhere Isoxanthopterinmenge als die entsprechenden Zellüberstände von Kontrollen (Abb.16; Tab.52; Tab.53).

Die Lymphozyten von dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühnern sind somit durch einen geringeren Biopterinegehalt der Zellen, jedoch eine höhere Isoxanthopterinabgabe in den Überstand gekennzeichnet.

Die Ergebnisse aus den Purin- und Pteridinstoffwechseluntersuchungen sprechen für das Vorhandensein einer Xanthinoxidase/dehydrogenase in aviären Blutlymphozyten mit erhöhter Aktivität in Zellen von dysgammaglobulinämischen Hühnern.

4.4. Untersuchungen zur Xanthinoxidase/-dehydrogenase

Die Resultate der Purin- und Pteridinbestimmung in aviären Lymphozyten und ihren Kulturüberständen ließen das Vorhandensein einer XOD sehr wahrscheinlich erscheinen, obwohl außer in Leukozyten von Ratten (Feigelson et al.1959) bei Mensch und anderen Säugern bisher keine XOD-Aktivität in Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (alKhalidi and Chaglassian 1965; Watts et al.1965; Scholar and Calabresi 1973; Peters and Veerkamp 1983). Beim Vogel wurde nur die Dehydrogenase-Form in Leber und Nieren gefunden (Remy et al.1955; McFarland and Coon 1980). Aussagen über das Enzym in peripheren Blutlymphozyten vom Huhn liegen nicht vor.

4.4.1. Bildung von Harnsäure in zerstörten und lebenden aviären Lymphozyten

Als Substrat wurde Xanthin verwendet, um mögliche, andere Stoffwechselwege, die z.B. vom Hypoxanthin ausgehen (salvage pathway), zu vermeiden. Als Nachweis diente die entstandene Harnsäure, gemessen mittels HPLC bei 254 und 280 nm.

Lymphozytenhomogenate, bei denen die Zellen entweder durch Ultraschall oder durch Einfrieren zerstört wurden, zeigten bei Inkubation über 5 Stunden keine Harnsäurebildung.

Weder bei Inkubation der Homogenate mit Sauerstoff (Elektronenakzeptor der XOD, Bruder et al.1983) noch mit NAD^+ (Elektronenakzeptor der XDH; Waud and Rajagopalan 1976) konnte Harnsäurebildung nachgewiesen werden. Um eine Konversion der Dehydrogenase-Form in die Oxidase-Form während der Homogeni-

sierung zu verhindern (Battelly et al.1972), wurde den Zellen vor der Aufarbeitung 2-Mercaptoaethanol zugesetzt. Weiterhin wurde die Harnsäurebildung mit Homogenaten getestet, denen Humanserumalbumin zugesetzt wurde, um die Verdünnung der zellulären Proteinkonzentration im Test auszugleichen (Bergmeyer 1973). In allen Versuchen mit Lymphozytenhomogenaten konnte keine XOD/XDH-Aktivität nachgewiesen werden.

Der Nachweis der XOD/XDH-Aktivität gelang in lebenden Lymphozyten, die über 5 Stunden in Trispuffer pH 8 (begast oder unbegast) mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin inkubiert wurden. Es zeigte sich, daß 1×10^7 DYS-Lymphozyten in den ersten 3 Stunden signifikant mehr Harnsäure bilden als KO-Lymphozyten (Abb.17; Tab.54; Tab.55). Damit wurde zum erstenmal XOD/XDH-Aktivität in aviären Blutlymphozyten nachgewiesen. Da eine Zuordnung des Enzyms zu einer bestimmten Form nicht möglich war und beim Vogel das Enzym nur als Dehydrogenase gefunden wurde (Krenitsky and Tuttle 1978), wird im weiteren Verlauf der Arbeit das Enzym als XDH bezeichnet.

4.4.2. Harnsäurebildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

Bei konstanter Substratmenge (Xanthin 200 $\mu\text{mol/l}$) war die Harnsäurebildung bei KO- und DYS-Tieren direkt proportional der eingesetzten Zellzahl (Abb.18; Tab.56; Tab.57), was durch die folgenden Regressionsgeraden ausgedrückt wird:

$$\text{KO:} \quad y = 7.25x + 13.28 \quad (r = 0.97)$$

$$\text{DYS:} \quad y = 11.0x + 16.21 \quad (r = 0.98)$$

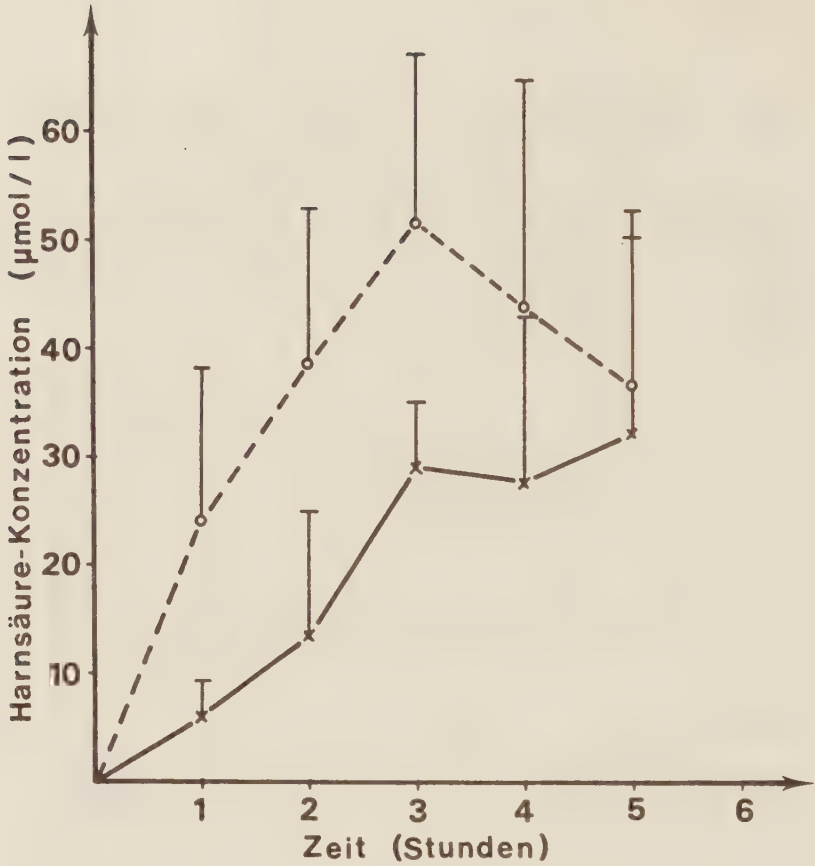


Abb.17 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung in intakten Lymphozyten von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Hühnern bei Inkubation mit Xanthin (100 µmol/l)

—x— Kontrollhühner
—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.54 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in intak-
ten KO-Lymphozyten (1×10^7) bei Inkubation mit Xanthin
(100 $\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)				
	1	2	3	4	5
1	4.32	15.17	22.09	18.65	21.58
2	2.56	3.20		8.41	11.10
3	8.98	5.97	34.92	43.34	57.91
4	8.98	29.75	29.95	39.92	38.57
$\bar{x}$	6.21	13.52	28.99	27.58	32.29
$\pm\text{SD}$	3.28	11.97	6.47	16.81	20.49

Tab.55 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in intak-
ten DYS-Lymphozyten (1×10^7) bei Inkubation mit Xanthin
(100 $\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)				
	1	2	3	4	5
1	46.52	60.66	73.66	76.00	56.54
2	23.90	26.90	37.45	25.41	34.18
3	15.08	25.69		26.81	38.96
4	24.95	39.92	44.76	39.01	35.97
5	9.97	39.92	50.31	51.97	16.89
$\bar{x}$	24.08	38.62	51.54	43.84	38.51
$\pm\text{SD}$	14.00	14.09	15.65	20.93	14.12

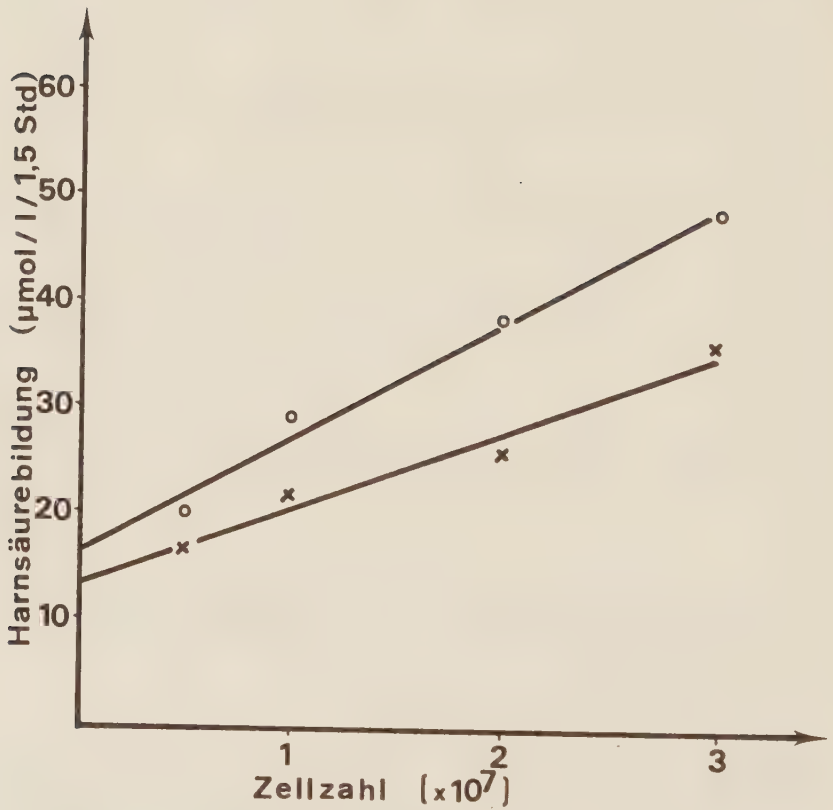


Abb.18 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit von der Zellzahl-nach 1.5 stündiger Inkubation mit Xanthin ($200 \mu\text{mol/l}$)

—x— Kontrollhühner

—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.56 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit von der KO-Zellzahl nach 1.5 stündiger Inkubation mit Xanthin (200 $\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zellzahl ($\times 10^7$)			
	0.5	1	2	3
1	15.54	17.34	20.31	30.99
2	15.72	20.83	20.83	39.16
3	15.21	24.60	30.94	35.45
4	11.78	17.85	24.53	33.91
5	25.46	28.14	32.13	40.45
$\bar{x}$	16.74	21.75	25.75	35.99
$\pm\text{SD}$	5.13	4.59	5.54	3.86

Tab.57 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit von der DYS-Zellzahl nach 1.5 stündiger Inkubation mit Xanthin (200 $\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zellzahl ($\times 10^7$)			
	0.5	1	2	3
1	20.60	29.74	36.67	51.98
2	15.06	22.39	32.34	44.30
3	17.47	15.99	30.30	45.45
4	11.89	34.98	46.34	53.00
5	35.10	42.98	46.50	-
$\bar{x}$	20.02	29.22	38.43	48.68
$\pm\text{SD}$	9.01	10.54	7.65	4.44

Die Linearität in den getesteten Zellkonzentrationsbereichen spricht für keine hemmenden Einflüsse aus dem Inkubationsansatz, für eine ausreichende Substratkonzentration und keine Hemmung durch das Produkt.

Die signifikant unterschiedliche Steigung der Geraden weist auf eine erhöhte Enzymkonzentration oder -aktivität in DYS-Zellen hin.

4.4.3. Bestimmung der apparenten kinetischen Größen K_m^i und V_{max}^i

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion muß im linearen Bereich des Zeitverlaufes stattfinden. Um zu zeigen, daß das gewählte Zeitintervall (1.5 Stunden) zur Bestimmung der apparenten kinetischen Größen für die beiden Extremkonzentrationen (50 und 500 $\mu\text{mol/l}$) im linearen Bereich liegt, wurde die Umsetzung von Xanthin für beide Konzentrationen bestimmt. Wie die Abbildungen 19 und 20 und die Tabellen 58-61 zeigen, ist die Voraussetzung der Linearität für beide Konzentrationen bis 2 Stunden sowohl für DYS-Tiere (50 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin: $y = 11.68x - 1.27$, $r = 0.97$; 500 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin: $y = 23.54x + 4.55$, $r = 0.91$) als auch für KO-Tiere (50 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin: $y = 9.52x - 1.89$, $r = 0.90$; 500 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin: $y = 12.14x + 1.51$, $r = 0.96$) gegeben.

Die Versuche zur Bestimmung der kinetischen Daten K_m und V_{max} ergaben unter zur Hilfenahme der normalen Plots (Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Scatchard, Hofstee) bei KO-Lymphozyten im Gegensatz zu DYS-Zellen keine Anpassung an eine Hyperbel (Abb.21; Abb.22; Abb.23).

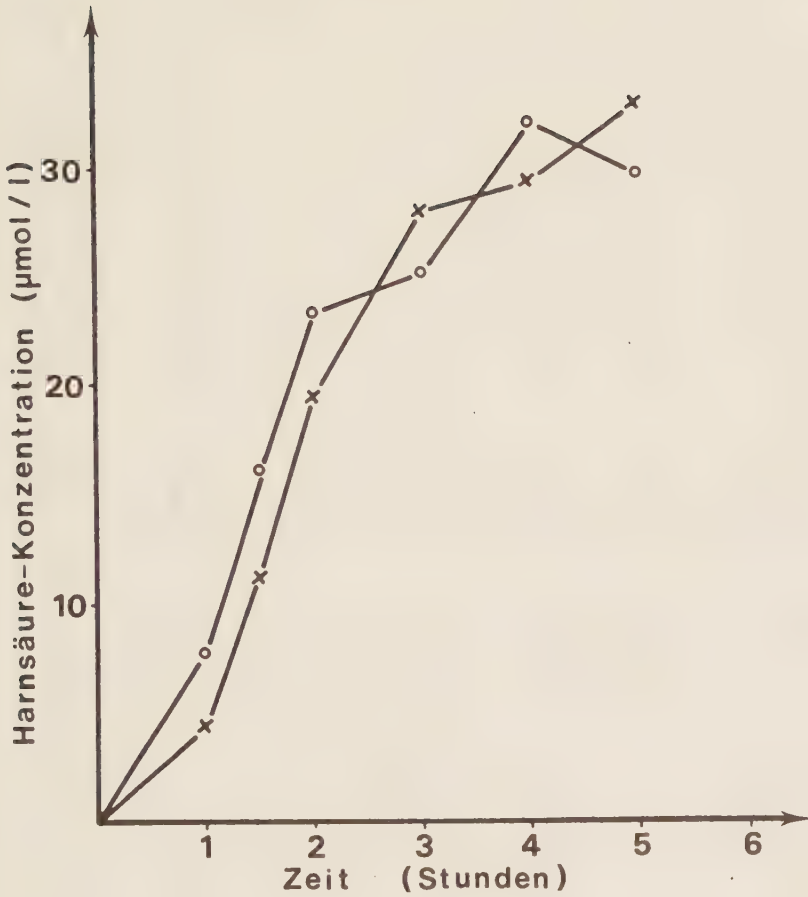


Abb.19 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung in Lymphozyten von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Hühnern bei Inkubation mit Xanthin (50 µmol/l)

—x— Kontrollhühner
—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.58 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) von KO-Hühnerlymphozyten bei Inkubation mit Xanthin ($50\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)					
	1	1.5	2	3	4	5
1	5.19	6.96	25.23	18.77	18.58	15.79
2	4.69	10.86	24.95	19.99	21.07	21.00
3	2.75	5.95	4.71	14.90	25.44	25.11
4	1.94	2.48	2.67	17.89	6.69	9.26
5	5.30	15.11	21.69	29.45	38.38	36.30
6	6.50	26.41	38.21	67.71	66.23	94.42
$\bar{x}$	4.39	11.29	19.59	28.12	29.40	33.12
$\pm\text{SD}$	1.71	8.58	13.57	20.01	20.76	34.77

Tab.59 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) von DYS-Hühnerlymphozyten bei Inkubation mit Xanthin ($50\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)					
	1	1.5	2	3	4	5
1	11.94	15.58	30.78	34.94	35.33	29.41
2	7.08	13.55	25.60	28.45	32.98	25.65
3	3.35	23.17	18.55	16.55	16.39	16.48
4	4.93	4.55	11.62	20.66	15.45	15.15
5	15.16	29.24	43.12	41.62	80.18	81.01
6	4.82	11.32	10.50	9.10	13.15	11.38
$\bar{x}$	7.88	16.23	23.36	25.22	32.25	29.84
$\pm\text{SD}$	4.66	8.78	12.46	12.08	25.32	25.97

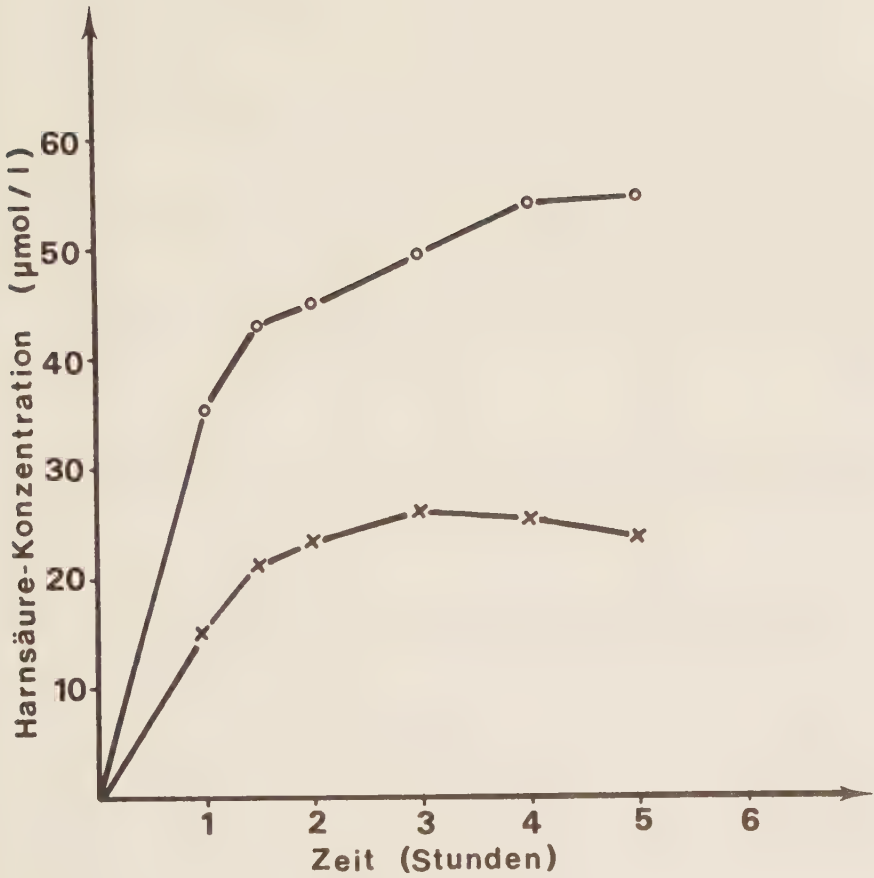


Abb.20 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung in Lymphozyten von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Hühnern bei Inkubation mit Xanthin (500 µmol/l)

—X— Kontrollhühner

—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.60 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) von KO-Hühnerlymphozyten bei Inkubation mit Xanthin ($500\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)					
	1	1.5	2	3	4	5
1	15.02	21.63	19.09	21.60	21.00	19.97
2	11.40	16.82	12.58	18.69	14.50	10.97
3	3.99	24.78	28.62	39.09	44.98	46.02
4	28.28	27.38	34.60	27.49	28.20	20.69
5	20.88	15.62	22.65	24.22	19.19	21.98
$\bar{x}$	15.91	21.25	23.51	26.22	25.57	23.92
$\pm\text{SD}$	9.23	5.04	8.50	7.89	11.91	13.09

Tab.61 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) von DYS-Hühnerlymphozyten bei Inkubation mit Xanthin ($500\mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)					
	1	1.5	2	3	4	5
1	23.43	51.60	37.48	52.67	50.42	54.99
2	67.74	67.83	60.29	64.29	66.28	72.57
3	13.21	52.79	86.92	99.52	111.81	99.52
4	15.24	22.66	38.87	32.78	36.81	38.87
5	49.19	32.77	20.48	23.16	32.96	35.15
6	44.01	32.17	28.12	26.68	29.45	29.44
$\bar{x}$	35.47	43.30	45.36	49.85	54.62	55.09
$\pm\text{SD}$	21.69	16.86	24.37	29.07	31.13	26.83

Bei Auftragung nach Michaelis-Menten (Abb.21; Tab.62; Tab.63; Harnsäurekonzentration/1.5 Std. gegen Substratkonzentration S) zeigen die KO-Zellen bis 200 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin einen sigmoiden Kurvenverlauf im Gegensatz zum linearen Anstieg bei DYS-Zellen. Unter Verwendung des T-Tests im sigmoiden Anteil der Kurve ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen KO- und DYS-Lymphozyten.

Die Auftragung nach dem Eadie-Scatchard-Plot (Abb.22) zeigt bei KO keine Gerade, sondern einen ansteigenden und abfallenden Ast. Dies spricht wie der sigmoide Kurvenverlauf der Michaelis-Menten Kinetik für eine positive Kooperativität des Enzyms, d.h. durch Anlagerung des ersten Substrates wird eine weitere Anlagerung verbessert.

Die Streuung der Daten (Tab.62) machte bei den KO-Zellen eine Plotauswertung schwer möglich. Die kinetischen Größen wurden daher aus der graphischen Darstellung nach Michaelis-Menten abgelesen.

Da die Messung auf Grund der Isolierungsprobleme (siehe 4.4.1.) an intakten Lymphozyten erfolgte, konnten Phänomene wie Diffusion und Transport nicht ausgeschlossen werden. Die ermittelten Größen werden deshalb als

K'_m = apparente Halbsättigungskonstante

V'_{max} = apparente maximale Geschwindigkeit

bezeichnet.

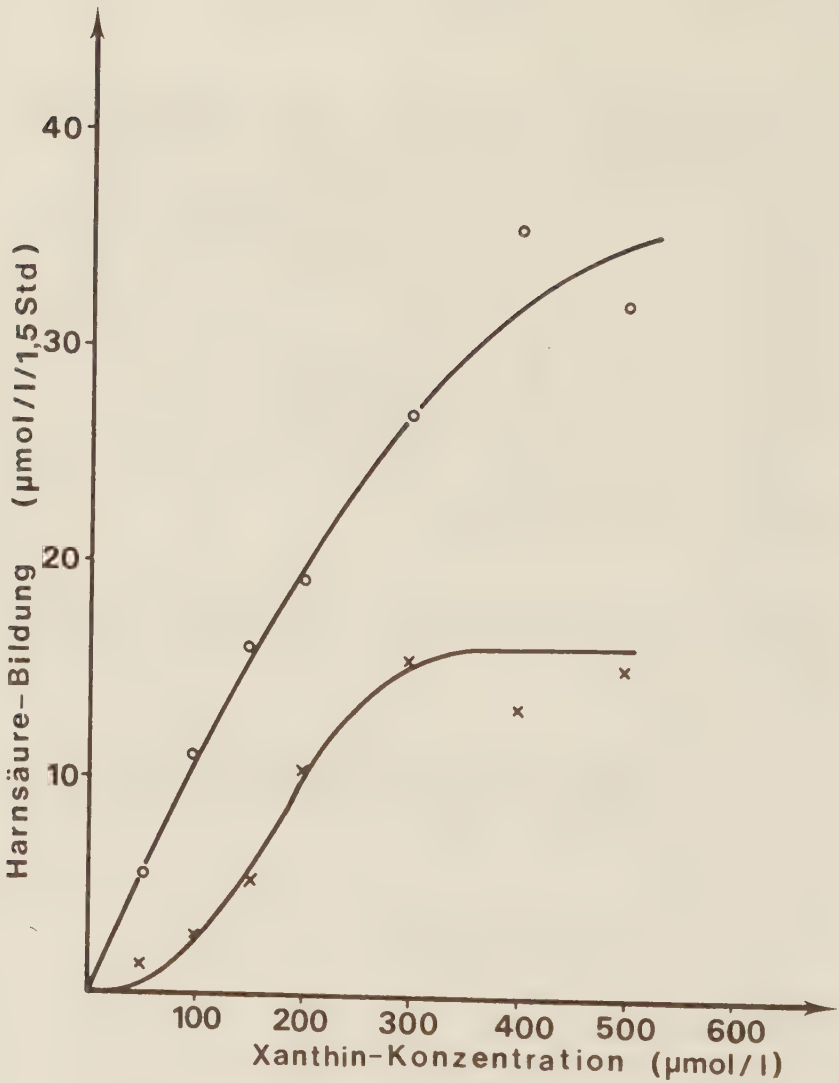


Abb.21 : Harnsäurebildung in Lymphozyten von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Hühnern in Abhängigkeit von der Xanthinkonzentration

—x— Kontrollhühner
—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.62 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l/1.5 Std}$) in KO-Lymphozyten
in Abhängigkeit von der Xanthinkonzentration

Tier Nr.	Xanthin ($\mu\text{mol/l}$)						
	50	100	150	200	300	400	500
1	0.0	0.0	3.19	5.10	8.21	9.52	10.34
2	0.0	2.85	4.34	14.48	20.87	18.07	17.91
3	4.98	3.34	4.45	10.07	18.76	8.04	10.95
4	0.0	3.11	11.42	13.18	13.17	17.31	22.09
5	0.0	2.03	5.06	5.19	6.71	10.38	14.61
6	4.83	7.13	8.42	19.18	27.55	20.95	19.62
7	0.0	0.0	0.95	4.95	13.08	9.09	10.88
$\bar{x}$	1.40	2.64	5.40	10.31	15.48	13.34	15.20
$\pm\text{SD}$	2.39	2.42	3.47	5.57	7.38	5.24	4.74

Tab.63 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l/1.5 Std}$) in DYS-Lymphozyten
in Abhängigkeit von der Xanthinkonzentration

Tier Nr.	Xanthin ($\mu\text{mol/l}$)						
	50	100	150	200	300	400	500
1	2.52	11.00	16.14	17.22	18.94	45.88	37.02
2	4.79	4.09	7.58	8.75	14.03	13.03	17.83
3	8.70	12.08	15.58	23.62	29.79	56.86	44.71
4	6.30	11.84	12.62	15.00	28.49	28.39	22.83
5	2.74	9.44	18.68	20.59	27.06	33.26	32.45
6	1.56	13.01	19.43	24.44	24.07	35.16	30.93
7	3.85	9.62	16.47	22.87	29.59	36.57	28.96
8	12.90	16.80	22.51	21.09	43.74	35.35	40.87
$\bar{x}$	5.42	10.99	16.13	19.20	26.96	35.57	31.95
$\pm\text{SD}$	3.79	3.62	4.53	5.30	8.77	12.68	8.95

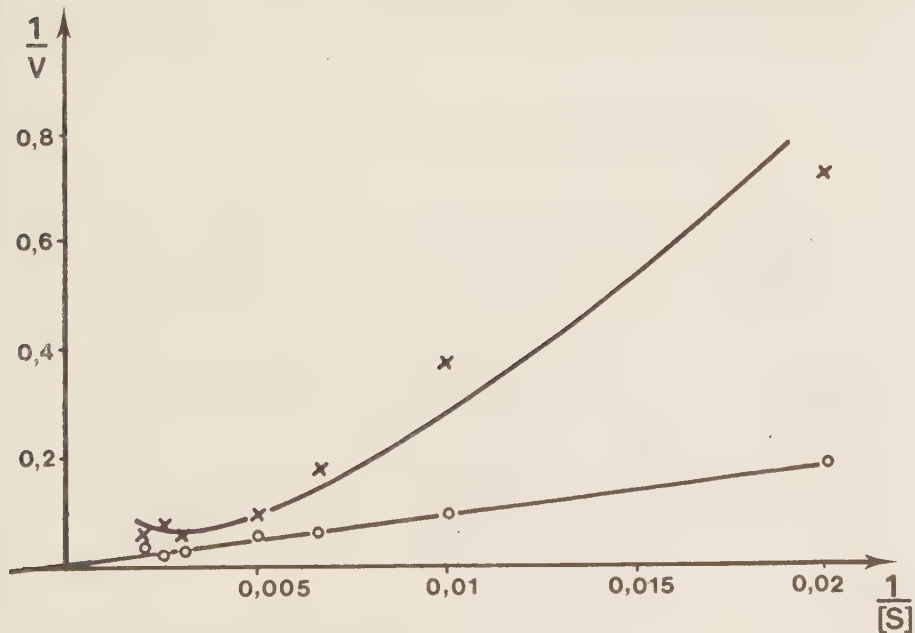
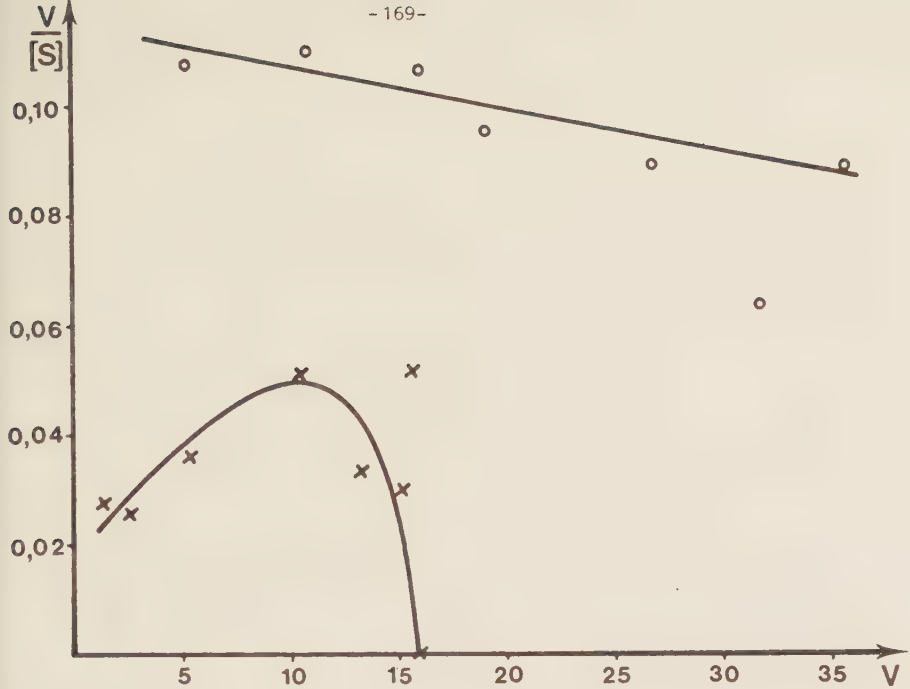


Abb.22 : Eadie-Scatchard Plot der Abb.19

—x— Kontrollhühner
—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Abb.23 : Lineweaver-Burk Plot der Abb.19

—x— Kontrollhühner
—o— dysgammaglobulinämische

Berechnung zu den apparenten kinetischen Größen bei DYS-Lymphozyten ergaben

$$K_m' = 558.81 \mu\text{mol/l}$$

$$V_{\text{max}}' = 64.58 \mu\text{mol/l/1.5 Std}$$

und die Bestimmung aus der graphischen Darstellung bei KO-Lymphozyten

$$K_m' = 170 \mu\text{mol/l}$$

$$V_{\text{max}}' = 15.0 \mu\text{mol/l/1.5 Std}$$

Die höhere V_{max}' bei DYS-Lymphozyten spricht dafür, daß pro Zelle mehr aktives Enzym enthalten ist. Das zeigen auch die Ergebnisse über die Abhängigkeit der Harnsäurebildung von der Zellzahl (siehe 4.4.2).

Die erhöhte K_m' spricht außerdem dafür, daß das Enzym in DYS-Lymphozyten von anderer Qualität ist.

4.4.4. Harnsäurebildung in aviären Lymphozyten nach Trypsinierung

Um eine mögliche Lokalisierung der XDH auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden aviäre Lymphozyten zur Entfernung von Oberflächenproteinen mit Trypsin behandelt. Nach Überprüfung der Viabilität mit Trypanblau wurden die Zellen mit Xanthin (500 $\mu\text{mol/l}$) versetzt und die Harnsäurebildung gemessen. Nach Inkubation über 3 Stunden ergab sich keine Verminderung der Harnsäurebildung in trypsinierten Zellen. Nach Behandlung ergaben sich sogar höhere Harnsäurekonzentrationen, wobei ab 2 Stunden DYS-Zellen signifikant mehr Harnsäure produzierten als KO-Zellen (Tab.64; Tab.65). Somit scheint die Lokalisierung

Tab.64 : Differenz der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) mit und ohne Trypsinbehandlung von KO-Lymphozyten (Xanthinkonzentration : $500 \mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)		
	1	2	3
1	2.42	2.80	2.75
2	-2.48	7.18	9.97
3	0.90	3.62	4.96
4	1.24	4.35	5.07
$\bar{x}$	0.52	4.49	5.69
$\pm\text{SD}$	2.10	1.90	3.05

Tab.65 : Differenz der Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) mit und ohne Trypsinierung von DYS-Lymphozyten (Xanthinkonzentration : $500 \mu\text{mol/l}$)

Tier Nr.	Zeit (Std)		
	1	2	3
1	-16.94	12.29	18.68
2	6.81	33.47	38.06
3	4.03	17.81	25.63
4	1.98	20.11	27.09
$\bar{x}$	-1.03	20.92	27.36
$\pm\text{SD}$	10.79	8.99	8.02

der XDH auf der Lymphozytenoberfläche unwahrscheinlich. Die Behandlung von Rattenleberrohextrakten mit Trypsin führte ebenfalls zu einer Erhöhung der XOD-Aktivität (Stirpe and Della Corte 1969). Dieser Effekt beruht möglicherweise auf einer Änderung der Konformation des Enzyms und damit besserer Substratbindungsfähigkeit.

4.4.5. Harnsäurebildung in aviären Lymphozyten bei pH 7.4

Alle Versuche über die XDH im Abschnitt 4.4. wurden mit dem unphysiologischen pH von 8.0 durchgeführt. Inkubation mit dem physiologischen pH von 7.4 ergab über 5 Stunden eindeutig Harnsäurebildung, wobei KO- und DYS-Lymphozyten ab 3 Stunden signifikant unterschiedliche Mengen an Harnsäure bildeten (Abb.24; Tab.66; Tab.67).

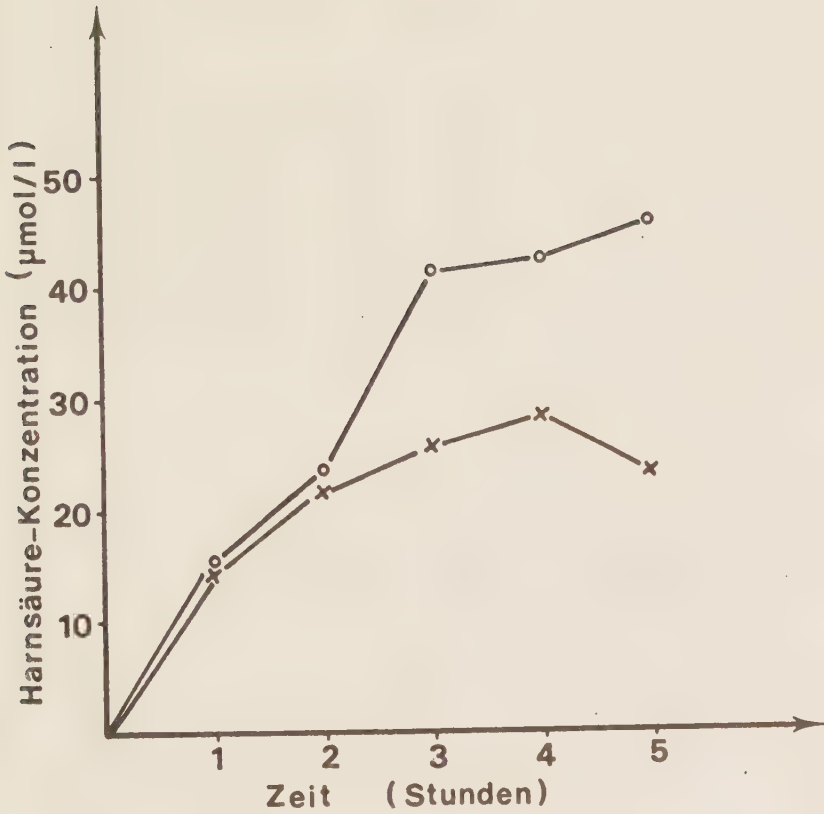


Abb.24 : Zeitabhängigkeit der Harnsäurebildung in Lymphozyten von Kontrollen und dysgammaglobulinämischen Hühnern bei Inkubation mit Xanthin (200 µmol/l) bei pH 7.4

—x— Kontrollhühner

—o— dysgammaglobulinämische Hühner

Tab.66 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in KO-Lymphozyten in
Abhängigkeit von der Zeit, bei pH 7.4
Xanthinkonzentration: 200 $\mu\text{mol/l}$

Tier Nr.	Zeit (Std)				
	1	2	3	4	5
1	5.93	7.95	12.94	19.16	14.05
2	10.03	12.38	26.94	21.98	21.75
3	34.64	41.44	47.61	51.74	33.29
4	10.73	24.84	15.66	20.84	25.16
$\bar{x}$	15.33	21.65	25.79	28.43	23.56
$\pm\text{SD}$	13.04	15.00	15.76	15.58	7.98

Tab.67 : Harnsäurebildung ($\mu\text{mol/l}$) in DYS-Lymphozyten in
Abhängigkeit von der Zeit bei pH 7.4
Xanthinkonzentration: 200 $\mu\text{mol/l}$

Tier Nr.	Zeit (Std)				
	1	2	3	4	5
1	17.11	31.90	50.78	60.36	56.41
2	17.13	20.84	23.04	28.31	24.35
3	13.90	28.19	64.13	57.39	73.38
4	14.34	14.50	29.26	24.92	31.16
$\bar{x}$	15.62	23.86	41.80	42.75	46.32
$\pm\text{SD}$	1.74	7.75	19.05	18.71	22.70

5. Diskussion.

5.1. Kulturmethoden

Die Gewinnung aviärer Blutlymphozyten erfolgt in der Literatur mit Hilfe der von Lee 1974 beschriebenen Langsamzentrifugation, nachdem vergleichende Untersuchungen über verschiedene Isolierungsmethoden den Ficoll-Gradienten als ungeeignet beschrieben (Lee 1974; Hovi et al.1978). Trotzdem wurde in dieser Arbeit die Gradientenzentrifugation über Ficoll-Paque nach Böyum 1968, die als Standardmethode zur Gewinnung von Säugerlymphozyten dient, verwendet. Wie bei Hovi et al.1978 zeigte sich, daß die Anwendung des Ficoll-Gradienten zu einer höheren und reineren Lymphozytenausbeute führt. Daß die so gewonnenen Hühnerlymphozyten nicht (Lee 1974) oder nur gering (Hovi et al.1978) mit Mitogen stimuliert werden können, wurde widerlegt. Nach 6-tägiger Kultivierung erzielte diese Methode sowohl hohe Überlebensraten der Zellen (Tab.3) als auch vergleichbare Stimulationswerte (Tab.3), wie sie andere Autoren (Lee 1974; Hovi et al.1978; Benedict et al.1980) nur mit Hilfe der Langsamzentrifugation erreichten. Somit ist anzunehmen, daß nach sorgfältigem Abheben der Zellen und dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 keine, möglicherweise störenden Ficoll-Reste den Zellen anhaften.

Um für weitere Untersuchungen (z.B. Ig-Produktion, Kokultur, Stoffwechseluntersuchungen) ein geeignetes in vitro System zur Hand zu haben, wurden Versuche zur Optimierung einer 6-tägigen Kultivierung von aviären Blutlymphozyten unternom-

men. Diesem System steht die sonst übliche Bestimmung der Proliferationsrate nach 3-tägiger Inkubation in Mikrotitrationsplatten gegenüber. PWM, ConA und andere Phytomitogene zeigen in diesem System ein Proliferationsmaximum an Tag 3 (Kirchner and Oppenheim 1972; Hirschhorn and Hirschhorn 1974; Lee 1974; Hovi et al. 1978). Da die Zellen in den Mikrotitrationsplatten nur über eine begrenzte Menge an Medium verfügen, das während der Inkubation nicht erneuert wird, kommt es bereits am 4. Tag zu einem Abfall der Proliferationsrate. Sowohl bei B- als auch bei T-Lymphozyten besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Reifung. Dieses Gleichgewicht wird im Verlauf der Kultivierung von Umweltfaktoren beeinflusst, unter anderem von der Zelldichte (Stewart and Hamill 1981), dem Nahrungsangebot und den entstehenden, zellulären Produkten (Melchers et al. 1975). Wenn die Kulturen nicht gefüttert werden, hören die Zellen auf zu proliferieren und inkorporieren somit kein Thymidin mehr. Unter Verwendung von Gewebekulturflaschen und dem teilweisen Austausch des Kulturmediums an Tag 3 wurden nach 6-tägiger Inkubation Proliferationsraten erhalten, die denen von Kirchner and Oppenheim 1972 und Hovi et al. 1978 am dritten Tag ermittelten Werten entsprechen.

Wie im humanen System, wo die PHA-Proliferation der Lymphozyten eindeutig von der initialen Zellkonzentration abhängt (Stewart and Hamill 1977; Bernheim et al. 1978), zeigen auch aviäre Lymphozyten einen Einfluß der Zellzahl auf die PWM-Stimulation (Abb. 1). Zellzahlen unter $1 \times 10^7/10 \text{ ml}$ erreichen nur geringe Proliferationswerte. Die Ergebnisse zeigen, daß relativ hohe Zellkonzentrationen nötig sind, um optimale, proliferative Antworten zu erreichen. Ursache dafür ist wahrscheinlich die erhöhte Möglichkeit der Zellinteraktion, die

für die Initiierung der mitogenen Antwort notwendig ist.

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Kirchner and Oppenheim 1972, Hovi et al.1978; Benedict et al.1980) war es nicht möglich, nach PWM-Zugabe in aviären Blutlymphozyten DNA-Synthese ohne Zugabe von Serum zu erreichen. Ein Teil dieser Diskrepanz zu den Ergebnissen anderer Autoren liegt möglicherweise in technischen Details wie Zellreinheit, Zelldichte und der Kultivierungsdauer.

Die Untersuchungen mit verschiedenen Seren als Mediumadditive ergaben mit FCS, wie bei Lee 1974, einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Proliferation bis zu einer Dosis von 10% (siehe 4.1.2.4.1.). Die Verwendung von heterologem FCS wurde zu Gunsten von homologem Hühnerserum (HS) aufgegeben, da signifikant bessere Stimulationsergebnisse (Tab.9) erzielt wurden und keine Probleme wie chargenabhängige Stimulation oder Inhibition durch FCS (Forsdyke 1973; Hovi et al.1978) zu befürchten waren. Frühere Untersuchungen über die mitogene Stimulierbarkeit von aviären Lymphozyten nach Zugabe von Hühnerserum ergaben geringere Proliferationsraten als Kulturen ohne Serumzusatz (Weber 1970; Kirchner and Oppenheim 1972). In neueren Arbeiten wurde aber eine eindeutige mitogene Stimulation aviärer Lymphozyten nach Kultivierung mit 1% Hühnerserum beschrieben (Pink and Vainio 1983). Die vorliegenden Untersuchungen zeigten einen deutlich positiven Einfluß von Hühnerserum auf die PWM-Stimulation (Abb.3).

Bei Zugabe von Serum agammaglobulinämischer Hühner zum Kulturmedium wurden signifikant höhere Stimulationsindices erzielt als mit normalem Hühnerserum oder Serum von DYS-Tie-

ren (Tab.11). Vergleichende Untersuchungen zwischen HS und A-HS in unseren Labors mit Hilfe der zweidimensionalen Immunelektrophorese ergaben keine Immunglobuline im A-HS aber signifikant höhere Konzentrationen im α -Proteinbereich und keine eindeutigen Differenzen bei den anderen Proteinen (Schranner et al.1982). Es ist nicht bekannt, ob das Fehlen der Immunglobuline oder andere Faktoren für die bessere PWM-Stimulation verantwortlich sind. Der große technische Aufwand, die sehr geringe Überlebensrate und nur gering verfügbare Serummengen dieser Tiere erlaubten keine permanente Kultivierung mit A-HS als Mediumadditiv.

Die Schlußfolgerung für die Notwendigkeit von Serum bezieht sich nur auf die PWM-induzierte DNA-Synthese nach 6 Tagen und nicht auf andere Parameter der Lymphozytenaktivierung oder -transformation.

DNA-Synthese und Zellteilung in mitogen stimulierten Lymphozyten folgen erst nach einer Vielzahl von Stoffwechseländerungen, wie z.B. der Zunahme des Membran-Phospholipid-turnovers (Fisher and Mueller 1968), der Membran-Adenylat-Cyclase Aktivität (Smith et al.1971b), Aufnahme von Aminosäureanalogen aus dem Medium (Mendelsohn et al.1971) mit erhöhter Proteinsynthese und der Freisetzung verschiedener Lymphokine. Es gibt Ergebnisse, daß frühe Stufen der Lymphozytentransformation wie Lymphokinproduktion (Rocklin et al.1974) und RNA-Synthese auch ohne Serumzugabe stattfinden. An Pferdelymphozyten konnte gezeigt werden, daß neben einer normalen RNA-Synthese die DNA-Synthese in serumfreiem Medium meistens gehemmt ist (Walker and Lucas 1971). Da aber festgestellt wurde, daß mit steigendem Serumgehalt weniger Lektin an die Lymphozytenmembran gebunden wird, vermutet man eine serumabhängige Modulation zwischen den kompetitiven Bindungsstellen für Serumproteine und dem Mitogenmolekül auf der Lymphozytenoberfläche im Sinne einer sterischen Hinderung (Loor 1974).

5.2. Zelluläre Aktivitäten

Pflanzenlektine veranlassen lymphoide Zellen zu den meisten Reaktionen, die bei der spezifischen, Antigen-induzierten Immunantwort beobachtet werden. Sie veranlassen T- und B-Zellen zur Proliferation; B-Zellen zur Immunglobulinproduktion; Monozyten, neutrophile Leukozyten, Killer-Zellen und T-Zellen zur Tötung fremder Zellen; T-Zellen und Monozyten zur Produktion von Lymphokinen und Monokinen sowie zur Ausbildung der Suppressor-Aktivität und T-Zell-Helferfunktionen (Oppenheim and Rosenstreich 1976).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, daß periphere Blutlymphozyten von Hühnern mit den Mitogenen PWM und ConA dosisabhängige Stimulation aufweisen. Außerdem wird erkennbar, daß sich die Immundefizienz der dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühner auch auf das Verhalten gegenüber den beiden Mitogenen auswirkt (Abb.6; Abb.7).

Bezüglich der optimalen Mitogenkonzentration in Hühnerzellkulturen variieren die Angaben bei PWM von 25 µg/ml (Benedict et al.1980) bis 50 µl/ml (Kirchner and Oppenheim 1972) und bei ConA von 20 µg/ml (Benedict et al.1980) bis 70 µg/ml (Kirchner and Oppenheim 1972). Aber auch andere optimale Konzentrationen der beiden Mitogene wurden beschrieben (Hovi et al.1978; Pink and Vainio 1983). Ein Teil dieser Diskrepanzen ist sicher auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen, wie z.B. verwendetes Medium, Serum und Mitogencharge zurückzuführen.

Während in der hier vorliegenden Arbeit die KO- und NO-Tiere ihre höchste Stimulation bei 15 bzw. 10 µl/ml PWM erreichten,

zeigten DYS-Zellen ihre höchste Proliferationsrate, die deutlich über den maximalen Werten von KO und NO lagen, bei 20 μ l/ml (Abb.6). Im Gegensatz dazu war die Stimulation mit ConA bei DYS-Tieren gegenüber NO und KO vermindert. DYS- und NO-Tiere erreichten das Proliferationsmaximum bei 70 μ g/ml, während das Stimulationsoptimum der KO-Tiere bei 50 μ g/ml lag (Abb.7). Periphere Lymphozyten von dysgammaglobulinämischen UCD 140 Hühnern, die mit PWM oder ConA stimuliert wurden, zeigten gegenüber Kontrolltieren keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit (Benedict et al.1977; Benedict et al.1980). Auch chemisch burssektomierte Hühner, deren humorale Immunität erloschen ist, waren hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Milzzellen mit PWM oder ConA gegenüber Kontrolltieren nicht unterschiedlich (Kirchner and Blaese 1973). Allerdings handelte es sich in diesen Fällen um 2- bzw. 3-Tage Kulturen. Zudem wurden die Unterschiede erst bei höheren Mitogenkonzentrationen deutlich. Bei den von Benedict et al.1977 verwendeten Mitogendosen zeigten sich auch hier nur geringe Unterschiede in der Stimulierbarkeit.

Das Dysgammaglobulinämie-Syndrom der UM-B19 Linie und der UCD 140 Hühner (Chanh et al.1980) zeigt weitgehende Ähnlichkeit mit einigen CVID-Patienten. Zum Teil weisen diese Patienten eine verminderte Lymphozytentransformation in vitro nach Zugabe von PHA, PWM oder ConA auf (Webster and Asheron 1974; Siegal et al.1978; Pahwa et al.1982). Die Zelltransformation mit ConA stellt eine T-Zellfunktion dar. Da die dysgammaglobulinämischen Tiere auf ConA im Vergleich zu Kontrollen mit einer stark verminderten Zellproliferation antworteten, kann bei ihnen wie bei Patienten mit CVID ein T-Zelldefekt vermutet werden.

Lektine binden an spezifische Zuckerstrukturen der Lymphozytenoberfläche. Möglicherweise ist die Bindungsfähigkeit der DYS-T-Lymphozyten für ConA oder die Transformationsfähigkeit herabgesetzt. Auch normogammaglobulinämische Hühner zeigten mit ConA eine Verschiebung der optimalen ConA-Konzentration zu höheren Dosen und eine geringere Stimulierbarkeit als Kontrolltiere. Da die DYS- bzw. NO-Tiere der UM-B19 Linie Homozygotie auf dem B-Komplex aufweisen, könnte der vermutete Defekt auf diesem Genlocus verankert sein.

In Kombination mit PWM erreichten die DYS-Tiere die höchsten Stimulationswerte bei erhöhter Mitogendosis. Janossy und Greaves beschrieben 1975, daß die PWM-induzierte Proliferation menschlicher, peripherer B-Zellen im Gegensatz zu Milz-B-Zellen T-Zell-abhängig ist. Die Zelltrennungsversuche bestätigen diese Aussage für das Vogelsystem (Tab.30; Tab.31). Kinetische Studien zeigten weiterhin, daß die Proliferation der B-Zellen mit PWM T-Zellen bzw. T-Zellprodukte benötigt, wobei die T-Zellabhängigkeit möglicherweise vom Reifungsgrad der peripheren B-Zellen abhängt (Keightley et al.1976; Hirano et al.1977).

Die veränderte Antwort von DYS-Lymphozyten auf PWM könnte an einer veränderten Bindungsfähigkeit der Lymphozyten für das Mitogen und/oder an einer extrem hohen B_M -Zellproliferation liegen, die aus der fehlenden Rückkopplung durch die unterdrückten B_G -Zellen oder einer mangelnden T_M -Suppressor-Zellaktivität resultiert. Quantitative Verschiebungen der Lymphozytenpopulationen im Nativblut von dysgammaglobulinämischen Hühnern konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

Erstaunlicherweise konnte mit PHA auch in hohen Konzentrationen keine Stimulation der Hühnerlymphozyten erzielt werden (Tab.27; Tab.28). Hovi et al.1978 setzten bei ihren Versuchen mit Hühnerlymphozyten verschiedene PHA-Präparationen ein und fanden mit gereinigtem PHA (Typ HA16, Wellcome Laboratories) ebenfalls keine Stimulation, obwohl das gleiche PHA Menschen- und Mäuse-lymphozyten unter gleichen Bedingungen schon bei einem Hundstel der eingesetzten Menge stimuliert. Sie schlossen daraus, daß die Komponenten, die die Hühnerlymphozytenproliferation induzieren, durch die Reinigung des Mitogens verloren gehen, und daß die für die Proliferation in Hühnerlymphozyten wichtigen Komponenten des PHA nicht mit den induzierenden Komponenten des Menschen- und Mäusesystems übereinstimmen.

LPS, das oft als B-Zellmitogen bei Mäusen eingesetzt wird, induziert bei Hühnerlymphozyten nur sehr geringe Stimulation (Weber 1973b; Vainio and Ratcliff 1984). In der vorliegenden Arbeit wurde mit LPS keine Stimulation von Hühnerlymphozyten erzielt (Tab.28).

Kokultivierungsansätze zwischen Lymphozyten gesunder und Immundefizienter menschlicher Probanden wurden unter anderem von Waldmann et al.1974; Schwartz et al.1977; Atwater and Tomasi 1978, Siegal et al.1978 und Hattori et al.1981 durchgeführt. Die Zellen von Patienten mit verschiedenen primären Immundefizienzen zeigten oft eine starke Suppressoraktivität und unterdrückten die Differenzierung normaler B-Zellen in vitro.

Bei Küken der UCD 140 Linie mit angeborener Dysgammaglobulinämie versuchten Chanh et al.1980 durch Kokultivierung periphe-

rer Blutlymphozyten mit intakten Kontrollzellen eine Isotyp-spezifische Suppression der Immunglobulinsynthese zu erzielen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen am Menschen erzielten Chanh et al. 1980 im Höchstfall eine 80% Suppression der IgG-Synthese. Sie postulierten daraufhin eine erhöhte T-Suppressoraktivität in dysgammaglobulinämischen Tieren, mit einem möglichen begleitenden T-Helferdefekt, wobei nicht geklärt wurde, ob die verminderte IgG-Synthese nicht auch durch eine reduzierte Überlebensrate bzw. verminderte Proliferationsfähigkeit der Zellen verursacht worden war.

In histokompatiblen NO/DYS-Kombinationen zeigte sich kein Effekt auf den ^3H -Tdr-Einbau und die Stimulierbarkeit mit PWM (Tab.32). Ebenso war die Überlebensrate der Zellen in den verschiedenen Kombinationen nicht verändert (Tab.33), was darauf hinweist, daß von DYS-Lymphozyten keine supprimierende Wirkung auf die Überlebensrate und die Proliferation von NO-Zellen ausgeht. Untersuchungen zur IgG-Synthese in histokompatiblen NO/DYS-Kokulturen nach der von Chanh et al. 1980 verwendeten Methode, ergaben nur in Kombinationen mit einzelnen DYS-Hühnern eine verminderte IgG-Synthese. Die Supprimierung erreichte aber nie mehr als 50% (Cihak, pers. Mitteilung). Somit erscheint ein Isotyp-spezifischer Suppressor als alleinige Ursache für die Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Hühnerlinie unwahrscheinlich.

Kombinationen nicht histokompatibler Lymphozyten ergaben entsprechend den Ergebnissen beim Mensch (Eijsvoogel et al. 1972) und Maus (Dutton 1965) erhöhte ^3H -Tdr-Einbauraten nach PWM-Stimulation.

Bei den Kokultorexperimenten mit peripheren Lymphozyten und über Nylonwolle getrennten T-Zellen, wurden die T-Zellfraktionen nicht bestrahlt um die T-Suppressorzellen nicht zu zerstören (Siegal et al.1978). Es zeigte sich, daß T-DYS keine supprimierende Wirkung auf die Proliferation von NO-Zellen ausüben (Tab.35), und daß T-NO den ^3H -Tdr-Einbau in DYS-Zellen leicht verbessern (Tab.36). Da die PWM-induzierte Proliferation von T-Zellen bzw. T-Helferfaktoren abhängt (Hirano et al.1977), deuten diese Ergebnisse auf eine verminderte T-Helferfunktion in DYS-Tieren hin, die bei Zugabe von NO-T-Zellen verbessert wird. Da der Anstieg nicht sehr hoch war, und die Helferfunktion über die MHC-Barriere wirksam ist (Hirano et al.1977), kann bei DYS-Tieren ein zusätzlicher Erkennungsdefekt auf den B-Zellen vermutet werden.

Die signifikant verminderte mitogene Antwort in NO/T-NO Kombinationen (Tab.35) könnte ihre Ursache im gestörten Verhältnis von B- und aktiven T-Zellen haben oder auf einem erhöhten Maß an Zelldifferenzierung beruhen.

Durch verschiedene Fütterungsarten und Zugabe von Kulturüberständen wurde überprüft, ob die Unterschiede der Proliferationsmaxima der peripheren Blutlymphozyten dysgammaglobulinämischer UM-B19 und Kontrollhühnern durch zelluläre Produkte, die während der Kultivierung entstehen, mit hervorgerufen wurden. Es zeigte sich, daß die Austauschfütterung an Tag 3 im Gegensatz zur Konzentratfütterung positive Auswirkungen auf die Proliferation hat (Abb.8; Abb.9). Frisches Medium an Tag 6 zeigte im Vergleich zu autologem Überstand keinen Effekt auf den ^3H -Tdr-Einbau (Abb.8; Abb.9). Somit scheinen eigene Stoffwechselprodukte, die sich während des Kultivierungs-

zeitraumes im Überstand ansammeln, ebenso wie ein erneutes Nahrungsangebot keinen entscheidenden Einfluß auf den 3H-Tdr-Einbau auszuüben.

DYS-Lymphozyten wurden weder durch neues Medium noch durch Kontrollüberstände stimuliert (Abb.9), so daß wahrscheinlich die mitogene Proliferation nicht durch supprimierende Faktoren bestimmter Zellklone beeinflußt wird. Dies zeigten auch die Kombinationen von KO-Zellen und DYS-Überständen (Abb.8), die zu einer signifikanten Erhöhung der Stimulation führten. Möglicherweise ist dies die Folge von Stoffwechselprodukten oder aktivierenden Faktoren die von UM-B19 Zellen freigesetzt werden, und die von den eigenen Zielzellen nicht verwertet oder erkannt werden können.

Die aktivierenden Faktoren können Lymphokine und Monokine sein, die von Lymphozyten bzw. mononucleären Zellen als Antwort auf eine antigene oder mitogene Stimulation gebildet und in das Medium abgegeben werden (Dumonde et al.1969).

5.3. Purin- und Pteridinstoffwechsel

Über den Puringehalt in aviären Lymphozyten bzw. ihren 6-Tage Kulturüberständen ist nichts bekannt. Die vorliegende Untersuchung ergab in aviären Lymphozyten Hypoxanthin, Xanthin und Uridin, andere Purin- bzw. Pyrimidinmetabolite waren nicht in nachweisbaren Mengen vorhanden. Die vergleichende Betrachtung von KO-, NO- und DYS-Zellen zeigte einen verminderten Hypoxanthingehalt und signifikant mehr Uridin in den DYS-Lymphozyten (Tab.41). Untersuchungen an 6-Tage Überständen von unstimulierten Zellen zeigten neben einer signifikanten Verminderung der Hypoxanthin- und Xanthinkonzentration eine signifikant höhere Harnsäuremenge in DYS-Proben als bei Kontrollen (Tab.42; Tab.43). Der Nachweis von Harnsäure spricht für das Vorhandensein eines Xanthin-abbauenden Enzyms in aviären Blutlymphozyten. Da Harnsäure in den Zellen nicht gefunden wurde, wird sie entweder sofort von der Zelle abgegeben oder wird erst während des Austritts aus der Zelle gebildet. Auch Barankiewicz und Cohen fanden 1985 bei Stoffwechseluntersuchungen an Rattenmakrophagen Harnsäure ausschließlich in Zellüberständen und schlossen daraus auf ein schnelles Ausschleusen von Harnsäure aus der Zelle.

Stimulation mit PWM hatte eine Abnahme der Hypoxanthin- und Harnsäurekonzentration im Medium von KO- und DYS-Lymphozyten zur Folge, die Xanthinkonzentration blieb unverändert (Abb.11). Während der mitogenen Stimulierung wird der Purinstoffwechsel und damit auch der salvage pathway aktiviert (Peters and Veerkamp 1983). Daß in den Überständen von

stimulierten KO- und DYS-Zellen gleiche Mengen an Harnsäure nachzuweisen waren, liegt wahrscheinlich daran, daß Hypoxanthin bis auf ein Mindestmaß über den salvage pathway verstoffwechselt wird und nur in geringen Mengen in das Medium abgegeben oder durch XDH zur Harnsäure abgebaut wird.

Die positive Wirkung der 6-Tage DYS-Überstände auf den ^3H -Tdr-Einbau von stimulierten KO-Lymphozyten (Abb.8) hat ihre Ursache somit wahrscheinlich nicht in einem erhöhten Purinmetabolitenangebot.

Die bei DYS-Lymphozyten und ihren unstimulierten 6-Tage Überständen gefundenen erniedrigten Hypoxanthin- und Xanthinkonzentrationen sowie die deutlich erhöhten Harnsäurewerte deuten auf einen veränderten Purinstoffwechsel mit möglicherweise erhöhtem Katabolismus in DYS-Lymphozyten hin.

Die Untersuchungen am Plasma von KO- und DYS-Hühnern ergaben keinen Unterschied im Harnsäuregehalt, aber signifikant weniger Hypoxanthin und Xanthin in den Plasmaproben von DYS-Tieren (Tab.44; Tab.45). Wie der Mensch besitzt der Vogel keine Uricase und scheidet als Endprodukt des Purinstoffwechsels die schwerer lösliche Harnsäure aus. Darüber hinaus stellt die Harnsäure beim Vogel auch das Endprodukt des Stickstoffstoffwechsels dar. Die Hauptrolle beim Purinabbau spielen beim Vogel die Nieren und nicht die Leber (McFarland and Coon 1980). Eine hohe de novo Synthese in der Niere ist mit einer hohen Harnsäurekonzentration im Blut korreliert (McFarland and Coon 1980). Die Plasmaspiegel in DYS- und Kontrollhühnern spiegeln nicht die hohen Unterschiede der

Harnsäurekonzentrationen in den Überständen der Lymphozyten der beiden Tierpopulationen (Abb.11) wider. Die Ursache dafür kann einmal in einer sehr effektiven Harnsäureausscheidung über die Niere liegen, zum anderen ist wahrscheinlich die Harnsäuremenge, die in Lymphozyten gebildet wird, nur ein Bruchteil des gesamten Harnsäurepools.

Hypoxanthin- und Xanthingehalt im Serum reflektieren ein dynamisches Gleichgewicht zwischen de novo Synthese und Zufuhr von Nahrungspurinen einerseits und Umbau und Ausscheidung andererseits (Hitchings 1978). Da beide Tiergruppen mit dem gleichen Futter versorgt wurden, kann ein nahrungsbedingter Unterschied ausgeschlossen werden. Der verminderte Xanthin- und Hypoxanthingehalt des DYS-Plasmas deutet wiederum auf eine Veränderung des Purinstoffwechsels hin.

Bei menschlichen Hypogammaglobulinämien wurden verschiedene Enzymdefekte im Purinstoffwechsel beschrieben, so die ADA-Defizienz, eine Verminderung der HGPRT-Aktivität oder das Fehlen der 5'-Nucleotidase (siehe Abschnitt 1.4.). Allison et al. berichteten 1977, daß Defekte im Purinstoffwechsel Immundefizienzen zur Folge haben und zeigten die Wichtigkeit der de novo Purinsynthese für die antigene und mitogene Stimulation. 1980 zeigten Nishida et al. die Bedeutung des salvage pathways für die Lymphozytenfunktionen.

Die Ergebnisse aus Zellen, Überständen und Plasma sprechen für einen veränderten Purinstoffwechsel bei dysgammaglobulinämischen Hühnern. Die geringere Hypoxanthinkonzentration deutet entweder auf einen erniedrigten Purinstoffwechsel (z.B. de novo Synthese, ADA-, 5'-Nucleotidase- oder PNP- Aktivität

erniedrigt), auf erhöhten salvage pathway (HGPRT erhöht) oder auf einen gesteigerten Abbau (XOD/XDH) hin. Die in unstimulierten Überständen gefundene erhöhte Harnsäurekonzentration spricht für einen erhöhten Katabolismus.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher die Wirkung von exogenem Hypoxanthin auf die mitogene Stimulierung, der Einbau verschiedener Purinmetabolite in stimulierte Zellen sowie der Hypoxanthinstoffwechsel in aviären Lymphozyten untersucht.

Hovi et al. zeigten 1977, daß durch Zugabe von Hypoxanthin die mitogene Antwort menschlicher Blutlymphozyten auf PHA erhöht wird. Da DYS-Lymphozyten weniger Hypoxanthin enthalten als KO-Zellen, wurde die Wirkung von Hypoxanthin auf die Zellproliferation mit PWM untersucht. Es zeigte sich, daß die PWM-induzierte Stimulation aviärer Lymphozyten durch exogenes Hypoxanthin nicht erhöht wird (Tab.46).

Nach mitogener Stimulation peripherer, menschlicher Lymphozyten ist sowohl der de novo als auch der salvage Purinstoffwechsel erhöht (Snyder et al.1973; Hovi et al.1977; Müller et al.1980; Nishida et al.1980). Zur Überprüfung des salvage pathways, der de novo Purinsynthese sowie eines möglichen Defektes der Adenosindesaminase wurden PWM-stimulierte Hühnerlymphozyten mit radioaktiv markiertem Hypoxanthin, Glycin und Adenin inkubiert. Es konnte gezeigt werden, daß bei der mitogenen Stimulation aviärer Lymphozyten sowohl die Purin de novo Synthese als auch der salvage pathway erhöht ist (Abb.12), Eine eindeutige Bevorzugung des salvage path-

ways wie in menschlichen Blutlymphozyten (Nishida et al.1980) konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Einbau der verschiedenen Metabolite bei den beiden Tiergruppen.

Um möglicherweise andere Purinstoffwechselveränderungen in DYS-Lymphozyten ausfindig zu machen, die den verminderten Hypoxanthingehalt in den Zellen und unstimulierten Überständen erklären, wurde der Stoffwechsel von Hypoxanthin in Lymphozyten untersucht. Nach einstündiger Inkubation mit radioaktiv markiertem Hypoxanthin wurden die verschiedenen Metabolite mittels HPLC getrennt. Bei beiden Tiergruppen war der salvage pathway gegenüber dem Katabolismus eindeutig bevorzugt (Abb. 14). Im Gegensatz zu Rattenmakrophagen (Barankiewicz and Cohen 1985) verstoffwechseln menschliche Blutzellen und isolierte Lymphozyten (Henderson et al.1974) ebenso wie aviäre Lymphozyten Hypoxanthin bevorzugt über den salvage pathway. Ein Unterschied der apparenten Aktivitäten der Purinstoffwechselenzyme zwischen KO- und DYS-Tieren wurde nicht nachgewiesen. Auch dieser Versuch weist auf das Vorhandensein einer XOD/XDH hin, da in der Harnsäurefraktion Radioaktivität gemessen wurde. Ein Unterschied im Katabolismus von Hypoxanthin durch XDH oder XOD in KO- und DYS-Zellen wurde nicht nachgewiesen. Der Grund liegt wahrscheinlich daran, daß der Hauptteil des Hypoxanthins nicht abgebaut sondern verstoffwechselt wird, außerdem geht durch die unspezifische Markierung des Hypoxanthins bei der Oxidation zu Harnsäure ein Teil der Radioaktivität verloren.

Zum ersten Mal wurden aviäre Lymphozyten und ihre 6-Tage Überstände auf den Pteridingehalt untersucht. In den Zellen wurden mit Biopterin, 6-Hydroxymethylpterin und 6-Fomylpterin die gleichen Komponenten gefunden, die auch in ConA-aktivierten Mäuselymphozyten nachgewiesen wurden (Ziegler 1984). Es zeigte sich, daß Lymphozyten von Kontrollhühnern signifikant mehr (circa 30%) Biopterin enthielten als Zellen von DYS-Tieren (Tab.51). Mit einer intrazellulären Konzentration von circa $70 \text{ pg}/10^6$ KO-Lymphozyten liegen die Werte deutlich unter denen von Beagle Hunden (Ziegler et al.1982a) und Menschen (Ziegler et al.1982b).

In 6-Tage Überständen von Hühnerlymphozyten konnten wegen störender Mediumbegleitstoffe nur Biopterin und Isoxanthopterin eindeutig bestimmt werden. Es zeigte sich, daß Stimulierung mit PWM zu einem signifikanten Anstieg der Biopterin- und Isoxanthopterinkonzentration im Kulturmedium von KO- und DYS-Lymphozyten führte (Abb.16). Während die Biopterinkonzentration nach Stimulierung bei beiden Tiergruppen um circa 50% anstieg, erhöhte sich die Isoxanthopterinkonzentration in KO-Überständen um den Faktor 2 bzw. in DYS-Überständen um den Faktor 3. Mit und ohne Stimulation enthielten KO-Überstände immer signifikant mehr Biopterin und signifikant weniger Isoxanthopterin als die entsprechenden Überstände von DYS-Lymphozyten (Abb.16).

Die nach Aktivierung von menschlichen T-Lymphozyten erhöhte Neopterinausscheidung (Fuchs et al.1982) sowie die Anhäufung von lymphozytärem Biopterin als vorangehende oder begleitende

Reaktion der graft versus host Reaktion (Fink et al.1983) weisen darauf hin, daß die Stimulation von Lymphozyten eine Zunahme der Pteridine zur Folge hat.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen drei Pteridinpools, die nach Iodierung von aviären Lymphozyten und ihren Überständen nachgewiesen werden konnten:

- a. Biopterin
- b. 6-Hydroxymethylpterin, 6-Formylpterin
- c. Isoxanthopterin

Durch saure Oxidation mit Hilfe von Iod wird der größte Anteil (circa 80%) des vorhandenen Tetrahydrobiopterins und 7,8,-Dihydrobiopterins in Biopterin umgewandelt (Fukushima and Nixon 1979). Tetrahydrobiopterin wird in der Zelle mit Hilfe der GTP-Cyclohydrolase über einige Syntheseschritte de novo gebildet. Nach ConA-Stimulation von Lymphozyten wurde eine starke Erhöhung der GTP-Cyclohydrolaseaktivität beschrieben (Rowe et al.1979).

Der Ursprung von 6-Hydroxymethylpterin und 6-Formylpterin ist nicht geklärt. Eine Umwandlung von Folat in 6-Hydroxymethylpterin wurde nur für maligne Zellen beschrieben (Stea et al.1978).

Isoxanthopterin entsteht durch Umsetzung von Pterin mit Hilfe der Xanthinoxidase (Forrest et al.1956). Das Endprodukt war nur in den Überständen in meßbaren Konzentrationen vorhanden, innerhalb der Zellen konnte es nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise erfolgt die Bildung während des Austritts durch die Zellmembran oder die entsprechenden Enzymsysteme werden mit den Vorstufen in das Medium abgegeben.

Der Nachweis von Isoxanthopterin ist somit wie das Auftreten von Harnsäure in den Überständen von aviären Lymphozyten ein Hinweis auf das Vorhandensein einer XOD/XDH in diesen Zellen.

Lymphozytäre Biopterinanhäufung ist das Ergebnis der normalen sowie der malignen Zellproliferation (Ziegler et al.1982a; Ziegler et al.1982b). Auch aviäre Lymphozyten zeigen nach 6-tägiger Kultivierung mit PWM erhöhte Biopterinkonzentrationen in den Überständen. DYS-Tiere enthielten sowohl in den Lymphozyten als auch den Überständen (mit und ohne Stimulation) signifikant weniger Biopterin aber signifikant mehr Isoxanthopterin. Da Isoxanthopterin bei aviären Lymphozyten anscheinend das Endprodukt des Pteridinkatabolismus darstellt, spricht die erhöhte Isoxanthopterinausscheidung in das Medium für eine erhöhte Pteridinsynthese mit erhöhtem Katabolismus bzw. erhöhter XOD/XDH-Aktivität.

Eine hemmende Wirkung von Isoxanthopterin auf die Entwicklung im Ei (Harris and Forrest 1967) und auf die Lymphoblastentransformation wurde beschrieben (Ziegler et al.1983). Jedoch hemmt es nur in serumfreien Kulturen, da es sich an ein α_1 -saures Glykoprotein, das im Serum vorhanden ist, anlagert (Ziegler et al.1983). Ein direkter Einfluß von Isoxanthopterin auf die Zellproliferation und Reifung nach mitogener Stimulierung in vitro bzw. antigener Stimulation in vivo ist darum unwahrscheinlich.

Da das nachgewiesene Biopterin wahrscheinlich zum größten Teil vom Tetrahydrobiopterin stammt, bedeutet eine Verminderung des Biopterin gehaltes auch vermindertes Tetrahydrobiopterin. Tetrahydrobiopterin fungiert außer als Cofaktor bei der Spaltung von Glyceryläthern (Tietz et al.1964; Pfleger et al. 1967), die bei der lektininduzierten Mitose eine Rolle spielen, auch als positiver Modulator der Interleukin-2 Aktivität (Zieg-

ler et al.1984). Es ist bekannt, daß die clonale Expansion der T-Lymphozyten von Interleukin-2 vermittelt wird. Interleukin-2 wird nach mitogener und antigener Stimulation von bestimmten T-Zellen synthetisiert und sezerniert (Farrar et al. 1982). Tetrahydrobiopterin erhöht die DNA-Synthese nach ConA-Stimulation von Mäusemilzzellen (Ziegler et al.1983). Die geringere Biopterin- und damit Tetrahydrobiopterinkonzentration in DYS-Lymphozyten und Überständen kann eine verringerte Modulation von IL-2 und somit veränderte T-Zellfunktionen zur Folge haben, wofür die geringere Stimulierbarkeit von DYS-Lymphozyten mit ConA spricht (Abb.7).

5.4. Xanthinoxidase/dehydrogenase

Das Vorhandensein von Harnsäure und Isoxanthopterin in Kultur-
überständen aviärer Blutlymphozyten ließ das Vorhandensein
eines xanthinabbauenden Enzyms (XOD oder XDH) sehr wahr-
scheinlich erscheinen. Obwohl in der Literatur das Vorhanden-
sein einer XOD/XDH in Säugerlymphozyten bestritten wird (al-
Khalidi and Chaglassian 1965; Watts et al. 1965; Scholar and
Calabresi 1973; Peters and Veerkamp 1983), gibt es eine Arbeit
von Feigelson et al. 1959, die mit Hilfe von radioaktiv markiert-
em Xanthin im Warburgapparat das Entstehen von markiertem
CO₂ in lebenden Rattenleukozyten zeigen konnte. In neueren
Arbeiten über den Pteridinstoffwechsel in mitogenaktivierten
Mäuselymphozyten konnte in den Überständen Isoxanthopterin
nachgewiesen werden (Ziegler 1985), was ebenfalls auf das
Vorhandensein einer XOD in Lymphozyten hinweist. Die Versuche
an lebenden, aviären Lymphozyten ergaben eindeutig, daß in
den Zellen eine aktive XOD oder XDH vorliegt (Abb. 17). Da
in Nieren und Leber von Vögeln nur eine XDH beschrieben
wurde (Krenitsky and Tuttle 1978; McFarland and Coon 1980),
handelt es sich bei dem in Lymphozyten nachgewiesenen Enzym
wahrscheinlich auch um eine Dehydrogenase.

Die Arbeiten, bei denen keine XOD-Aktivität nachgewiesen wer-
den konnte, wurden vorwiegend mit teilsoliertem Enzym nach
Ultraschallbehandlung (Scholar and Calabresi 1973; Watts et
al. 1965) unternommen. Auch aviäre Lymphozyten zeigten nach
Behandlung mit Ultraschall oder Tieffrieren mit flüssigem Stick-
stoff und anschließendem Auftauen zum vorsichtigen Aufbrechen
der Zellmembran keine Aktivität der XDH, so daß sich weitere
Reinigungsschritte erübrigten. Zugabe von Humanserumalbumin
zur Erhaltung der Proteinkonzentration (Verdünnung bei der
Homogenisierung, siehe Abschnitt 3.6.1.) und damit vielleicht

der Aktivität des Enzyms, erwies sich ebenso als erfolglos wie die Zugabe von 2-ME als Oxidationsschutz, oder von NAD^+ bzw. Sauerstoff, um eine genügend hohe H^+ -Akzeptorkonzentration zu gewährleisten. Möglicherweise ist die XDH in aviären Lymphozyten membrangebunden oder benötigt Membrankontakt, da dieses Enzym sowohl in löslicher als auch membrangebundener Form beschrieben wurde (Bruder et al.1982). Außerdem ist bekannt, daß dieses Enzym schon durch kleine Manipulationen von der Dehydrogenase- in die Oxidase-Form umgewandelt wird (Battelli et al.1972). Möglicherweise reicht bei Lymphozyten schon das Aufbrechen der Zellmembran aus, um das Enzym zu inaktivieren.

Als Substrat wurde Xanthin anstelle von Hypoxanthin verwendet, um eine mögliche Oxidation durch die Aldehyd-Oxidase(Krenitsky et al.1972) oder eine Umsetzung durch die HGPRT auszuschießen. Es zeigte sich, daß im Vergleich zu Kontrollen Zellen von DYS-Tieren bei Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin als Substrat im Verlauf von 5 Stunden signifikant mehr Harnsäure bilden (Abb.17). Die nach 4 Stunden abfallenden Werte der Harnsäurekonzentration beruhen wahrscheinlich auf dem teilweisen Zerfall von Lymphozyten, was mit Hilfe der Trypanblau-Färbung nachgewiesen werden konnte.

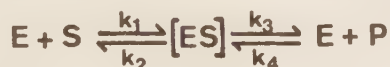
Daß DYS-Zellen signifikant mehr Harnsäure bilden bestätigen auch die Versuche über die Harnsäurebildung in Abhängigkeit von der Zellzahl (Abb.18; Tab.56; Tab.57) sowie die Inkubation mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin (Tab.60; Tab.61). Bei 50 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin scheint kein Unterschied zu bestehen (Tab.58; Tab.59), doch wurden bei diesen Ergebnissen die aus dem intrazellulären Pool ohne exogene Xanthinzugabe entstehenden Harnsäuremengen auf Grund der limitierten Zellzahl, die pro Ansatz von einem

Tier erhalten werden konnte, ohne das Tier zu töten, vernachlässigt. Das ist auch die Ursache, warum bei den Versuchen mit unterschiedlicher Zellzahl (Abb.18) die Geraden nicht durch den Nullpunkt gehen.

In Anlehnung an das pH-Maximum der Rattenleber XOD (Prajda et al.1976) als auch der XDH in Hühnerleber (Remy et al.1955) wurden die Untersuchungen bei pH 8 durchgeführt. Weitere Versuche mit dem für Hühner physiologischen Blut-pH von 7.4 (Tazawa et al.1983) ergaben, daß sich der Unterschied in der Umsetzung von Xanthin zu Harnsäure in KO- und DYS-Lymphozyten über einen Zeitraum von 5 Stunden nach 3 Stunden ebenfalls einstellt (Abb.24), d.h. auch unter physiologischen Bedingungen zeigen die beiden Tiergruppen unterschiedliche Harnsäurebildung. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß in den Zellen möglicherweise durch Kompartimentierung jederzeit der optimale pH-Bereich für ein Enzym erreichbar ist. Zudem spielt der pH-Wert für das Enzymsystem in vivo wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da Änderungen der Enzymaktivität durch andere cooperative Wechselwirkungen erreicht werden können.

Die Notwendigkeit, die Nachweise an lebenden Zellen zu unternehmen, ergaben ein sogenanntes "black Box" Problem. In diesem System können Aussagen über die wirkliche Enzymaktivität wie am isolierten Enzym nicht gemacht werden.

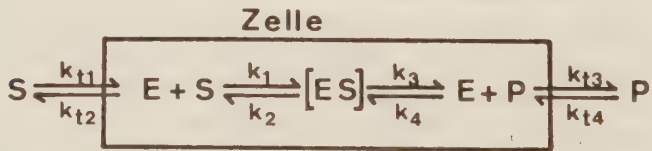
Als Maß für die Aktivität eines Enzyms werden die Maximalgeschwindigkeit V_{max} und die Michaeliskonstante K_m benutzt. Bei einer Enzymreaktion handelt es sich aber um mehrere Einzelvorgänge. Die Geschwindigkeitskonstanten werden mit k abgekürzt. Die enzymatische Reaktion läßt sich im einfachsten Fall durch folgendes Schema darstellen:



Der langsamste Schritt bestimmt die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit. V wird daher durch den Zerfall des Enzym-Substrat(ES)-Komplexes in die Endprodukte (Enzym + Produkt P) bestimmt. Bei einem intakten Zellsystem jedoch muß das Substrat erst in die Zelle transportiert werden oder diffundieren sowie das Produkt aus der Zelle entweichen oder weiter verstoffwechselt werden, um eine Enzymreaktion zu ermöglichen und eine negative Rückkopplung zu verhindern. Im Falle der Bestimmung der kinetischen Größen K_m und V_{max} der XDH in Hühnerlymphozyten wurde deshalb nur von apparenten kinetischen Größen gesprochen.

Davon ausgehend, daß es sich dabei um den einfachsten Ablauf handelt (siehe unten) ergeben sich folgende Aussagemöglichkeiten:

- a) Geschwindigkeit des Transportes (des Substrates und des Produktes) größer als V_{max} des Enzyms, dann ist eine Messung der Kinetik des Enzyms möglich.
- b) Geschwindigkeit des Transportes von S und/oder P kleiner als V_{max} des Enzyms, dann wird der Transport gemessen.
- c) Bei gleicher V_{max} von Transport und Enzymreaktion ist der Schritt mit der größten K_m geschwindigkeitsbestimmend.



Die über den Xanthintransport vorliegenden Untersuchungen am Choroid Plexus von Fischen (Nelson and Cserr 1976), am Intestinum von Hühnerembryos (Taube and Berlin 1970) und

in polymorphkernigen Leukozyten von Ratten (Hawkins and Berlin 1969) ergaben Michaelis-Konstanten zwischen 2 - 40 $\mu\text{mol/l}$. Die Werte für die V_{max} können bis auf die Befunde bei Rattenleukozyten (bei 10^7 Zellen: $K_m = 2.3 \mu\text{mol/l}$; $V_{\text{max}} = 2.48 \mu\text{mol/l/1.5 Std}$) für einen Vergleich nicht herangezogen werden, da sie auf das Gewicht der Gewebe bezogen sind. Die apparenten kinetischen Parameter für die Umsetzung von Xanthin zu Harnsäure in aviären Lymphozyten (10^7) waren in Kontrollen: $K_m^i = 170 \mu\text{mol/l}$, $V_{\text{max}}^i = 15 \mu\text{mol/l/1.5 Std}$, und bei DYS-Zellen: $K_m^i = 558 \mu\text{mol/l}$, $V_{\text{max}}^i = 64 \mu\text{mol/l/1.5 Std}$ (Abb.21). Das deutet darauf hin, daß der Xanthintransport wahrscheinlich nicht der limitierende Schritt ist und die gemessenen Werte die apparenten kinetischen Größen der XDH wiedergeben.

Die Untersuchungen zu den apparenten kinetischen Größen ergaben bei DYS-Tieren sowohl eine erhöhte V_{max}^i als auch eine erhöhte K_m^i .

Die höhere apparente maximale Geschwindigkeit V_{max}^i deutet darauf hin, daß DYS-Lymphozyten erhöhte XDH-Enzymaktivität aufweisen, diese kann sowohl die Folge einer höheren Enzymkonzentration als auch einer erhöhten Aktivität sein. Die erhöhte Enzymkonzentration kann das Ergebnis einer erhöhten Enzymsynthese oder eines verminderten Enzymabbaus sein. Die höhere K_m^i spricht für eine andere Qualität des Enzyms bei DYS-Tieren. Darauf weist auch der unterschiedliche Verlauf der Michaelis-Menten Kinetik und ihrer linearisierten Darstellungen hin (Abb.21 - 23). Während KO-Lymphozyten bei niedrigen Substratkonzentrationen einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigen, verläuft die Umsetzung von Xanthin zu Harnsäure bei DYS-Tieren nach der Michaelis-Menten Kinetik. Dies spricht für positive Coopera-

tivität der XDH bei KO-Tieren. Über einen cooperativen Effekt der XOD/XDH ist in der Literatur nichts beschrieben.

Die Aktivität der XOD/XDH kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Schon während der Entwicklung vom Embryo zum adulten Tier verändert sich ihre Aktivität stark (Morgan 1930; Murison 1969; Lee 1973). Verabreichung von RNA, Hypoxanthin oder Fructose an Menschen führt zu einer 2-4 fachen Erhöhung der Aktivität des Leberenzym (Marcolongo et al.1974). Bei einer Erhöhung der Proteinkonzentration im Futter steigt die Enzymaktivität sowohl in der Rattenleber (Rowe and Wyngaarden 1966) als auch in der Hühnerleber (Itoh and Tsushima 1974). Außerdem wird die Aktivität des Enzyms beim Huhn durch zunehmende Purinaufnahme (Woodward et al.1972) und bei der Ratte durch Vitamin E Defizienz (Catignani et al.1974) erhöht.

Bei manchen Gichtpatienten wurde eine Erhöhung des Leberenzym (nicht Dünndarmenzym) nachgewiesen (Marcolongo et al.1974), und die sogenannte HUA(high uric acid)-Hühnerlinie mit erblicher Gicht weist eine Erhöhung der XDH-Aktivität in Nieren und Leber auf (McFarland and Coon 1980).

Eine Erhöhung der XDH-Aktivität bei DYS-Lymphozyten durch Induzierung aus der Nahrung ist auszuschließen, da die beiden Tierpopulationen mit dem selben Futter versorgt wurden. Eine Beeinflussung durch andere Abweichungen im Purinstoffwechsel der Lymphozyten ist auf Grund der Stoffwechseluntersuchungen mit radioaktivem Hypoxanthin (Abb.14) unwahrscheinlich. Möglicherweise ist die XDH-Aktivität in DYS-Lymphozyten auf Grund eines abnormal hohen Bedürfnisses an essentiellen Aminosäuren erhöht, das den Vogel dazu bringt, große Mengen von Protein abzubauen. Im Gegensatz zum Säuger scheiden die Vögel prinzipiell ihren Stickstoff über die Harnsäure aus, wobei die Nieren die Hauptrolle spielen.

Erklärbar ist damit nicht die veränderte Qualität der XDH in DYS-Zellen. Möglicherweise beruht sie auf der selben ontogenetischen Störung in der Lymphozytenentwicklung, die schon für das Ausbleiben des switches der IgM-Zellen zu IgG-Zellen als Ursache angesehen wird.

5.5. Modellvorstellung über die Dysgammaglobulinämie

Die erbliche Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Hühnerlinie ist gekennzeichnet durch eine extreme Erniedrigung des Serum IgG-Spiegels bei gleichzeitig erhöhtem Serum IgM und IgA (Lösch et al.1981). Versuche über die Fähigkeit zur Antikörperbildung zeigten, daß DYS-Hühner nach Verabreichung von T-abhängigen Antigenen zur Bildung von Antikörpern der IgM-Klasse veranlasst werden (Lösch et al.1982), Kontrollhühner antworten darauf mit einer hohen IgG-Antwort. Bei Applikation von T-unabhängigen Antigenen zeigen DYS-Hühner neben einer vorherrschenden IgM-Antikörperantwort auch Antikörper der IgA-Klasse (Lösch et al.1982). LPS bzw. Levamisol konnte einen Teil der Tiere zur vorübergehenden IgG-Synthese anregen (Kühlmann-Rabens et al.1986). In Bezug auf die zellvermittelten Reaktionen in vivo (Transplantatabstoßung; graft versus host Reaktion und der Allergie vom verzögerten Typ) zeigten die immundefizienten Tiere voll erhaltene T-Zellfunktionen (Lösch 1972). Hämatologische und histologische Untersuchungen zeigten keine Veränderungen der lymphatischen Organe und innerhalb der Lymphozytenpopulationen (Lösch und Hoffmann-Fezer 1973), nur cytoplasmatisch-IgG-positive Zellen fehlten völlig (Hoffmann-Fezer and Lösch 1983).

Der als MHC-unabhängig geltende Immundefekt der erblich dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühner kann sowohl durch Abweichungen auf der T-Zellseite als auch auf der B-Zellseite verursacht sein (Lösch et al.1981; Lösch et al.1982). Zu den möglichen primären B-Zelldefekten zählen solche, die durch eine nicht voll funktionsfähige Bursa, deren induktiver Einfluß

zur Ausreifung der B_G-Zellen nötig ist, bewirkt werden (Kincade and Cooper 1983; Lawton et al. 1975). Weiterhin kommen Defekte der B-Zellrezeptoren und somit des Empfangs von T-Helfersignalen, sowie das Fehlen eines negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen IgG und IgM in Frage (Subba Rao et al. 1978). Andererseits sind Störungen auf der T-Zellseite in Betracht zu ziehen: Mangel an Isotyp-spezifischen Helferzellen, defekter T-Helferfaktor, Erhöhung der Isotyp-spezifischen Suppression auf B_G-Zellen mit gestörtem T-Helfer zu T-Suppressor Verhältnis.

Bei der Ursache des Defektes kann es sich zunächst nur um eine eingeschränkte und nicht um eine fehlende Funktion handeln, da DYS-Tiere prinzipiell zur IgG-Synthese befähigt sind (initialer IgG-Peak bei manchen Tieren, transitorischer Defekt, kein Auftreten von dysgammaglobulinämischen Tieren nach Keimfreihaltung). Ein primärer Stammzelldefekt ist somit auszuschließen. Es liegen Hinweise dafür vor, daß bei den UM-B19 Tieren neben einer Unterdrückung der IgG-Synthesefähigkeit auch ein hypersensibles IgM-IgA-System vorliegt.

Die Dysgammaglobulinämie wird vererbt, aber die vorhandenen Ergebnisse erlauben keine endgültigen Rückschlüsse auf den Erbgang.

Das Auftreten von DYS-Nachkommen bei Kreuzung von DYS-Hühnern mit Kontrollen läßt auf eine Kontrolle von mehr als einem Gen mit variierender Penetranz schließen. Die unvollständige Penetranz eines möglichen additiven Gens ist mit den normalen IgG-Spiegeln in Hühnern, deren Eltern dysgammaglobulinämisch waren, zu begründen. Ein möglicherweise heterozygotes additives

Gen kann nicht ausgeschlossen werden. Außerdem kann eine Anzahl von weiteren Genloci an den verschiedenen Merkmalen dieser Störung beteiligt sein, ähnlich der multigenetischen Ätiologie der Autoimmun-Thyreoiditis bei Hühnern (Rose et al. 1977).

Wegen der grundsätzlichen Fähigkeit zur IgG- bzw. IgG-Antikörpersynthese wurde eine B-Zellreifungsverzögerung durch ein möglicherweise verändertes Bursamikroenvironment und daraus resultierendem gestörten T-Helfer-T-Suppressor-Verhältnis postuliert, wobei defekte Helferfaktoren sowie ein Defekt der B-Zellrezeptoren nicht ausgeschlossen wurden.

Die vergleichenden Untersuchungen zur mitogenen Stimulation aviärer Blutlymphozyten zeigten eine verminderte Antwort von DYS-Zellen auf ConA (Abb.7), was auf eine Veränderung innerhalb der T-Zellpopulation hinweist. Die Ursache liegt entweder in einer verschlechterten Bindung des Mitogens an die T-Zellen, oder der T-Helferfaktor für die clonale Expansion (Il-2) der T-Zellen wird vermindert gebildet. In den Kokultorexperimenten unterdrückten T-Zellen von DYS-Tieren die mitogene Antwort histokompatibler NO-Zellen nicht, während NO-T-Zellen die PWM-Antwort von DYS-Lymphozyten leicht erhöhten (Tab.35; Tab.36). Dies ist ein Hinweis dafür, daß DYS-Zellen keine supprimierenden Faktoren freisetzen, die die Überlebensrate der Zellen während der Kultivierung oder die mitogene Antwort beeinflussen. Dies bestätigten auch die Überstandsversuche (Abb.8). Vielmehr deuten sie darauf hin, daß bei DYS-Tieren entweder die T-Helferzellen nicht voll funktionsfähig sind oder T-Helferfaktoren ungenügend gebildet werden, und die B-Zellen außerdem die Helfersignale schlechter erkennen.

Die erstmalige Untersuchung von Purin-, Pyrimidin- und Pteridinmetaboliten in aviären Lymphozyten zeigte, daß DYS-Zellen und ihre Überstände signifikante Veränderungen im Uridin-, Hypoxanthin-, Xanthin-, Harnsäure-, Biopterin- und Isoxanthopteringehalt gegenüber Kontrollen aufwiesen. Untersuchungen zum zellulären Purinstoffwechsel ergaben keine sichtbaren Veränderungen der einzelnen apparenten Enzymaktivitäten. Die hohen Harnsäure- und Isoxanthopterkonzentrationen in Überständen von DYS-Lymphozyten waren ein Hinweis auf das Vorhandensein einer XDH in aviären Lymphozyten, sowie auf eine erhöhte Aktivität des Enzyms bei DYS-Zellen. Außerdem zeigten die Untersuchungen der apparenten kinetischen Größen K_m und V_{max} , daß die XDH in DYS-Zellen neben einer erhöhten Aktivität auch von anderer Qualität ist.

Purin- und Pteridinstoffwechsel sind für die Zelle und ihre Funktionen von Bedeutung, obwohl die genauen Zusammenhänge genetisch bedingter Enzymdefizienzen und Immundefekten noch nicht geklärt ist. Der erhöhte Katabolismus über die XDH führt möglicherweise zu einer verminderten Verstoffwechslung von Hypoxanthin über den salvage pathway bzw. zu erniedrigten Biopterin- und Tetrahydrobiopterinkonzentrationen in DYS-Lymphozyten. Tetrahydrobiopterin ist ein positiver Modulator der IL-2 Aktivität (Ziegler et al.1984). Die wahrscheinlich verminderte Tetrahydrobiopterinkonzentration in DYS-Lymphozyten kann eine geringere Modulation der Interleukin-2 Aktivität und somit veränderte T-Zellfunktionen zur Folge haben, wofür die geringere Stimulierbarkeit von DYS-Lymphozyten mit ConA spricht. Außerdem fungieren bestimmte Pteridine als Cofaktoren für die Aminosäuresynthese und sind ein Teil des Cofaktors

der XDH. Vielleicht hat der erhöhte Pteridinkatabolismus einen erhöhten Aminosäureumsatz zur Folge bzw. veränderte Pteridin-metabolitenkonzentrationen beeinflussen ihrerseits die Aktivität der XDH.

Die XDH-Aktivität im Vogelei zeigt entwicklungsabhängige Veränderungen. Zur selben Zeit wie die XDH-Aktivität im Dottersack ansteigt, vollzieht sich in der Bursa der switch der Lymphozyten von IgM zu IgG. Die Faktoren, die zu einem veränderten Bursamikroenvironment führen, könnten auch die XDH in den Lymphozyten beeinflussen. Vielleicht ist dies der Grund für die veränderte Qualität des Enzyms bei DYS-Tieren. Die Bursa ihrerseits beeinflußt die Entwicklung des Thymus und somit die T-Zellpopulationen. Ein Bursadefekt kann sowohl zur Ausbildung erhöhter T-Suppressorzellaktivität (Blaese et al.1974; Grebenau et al.1976) als auch zu ungenügender T-Zellhilfe führen (Grebenau and Thorbecke 1978).

Bei der Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Hühner handelt es sich wahrscheinlich um einen B-Zellreifungsdefekt durch verändertes Bursaenvironment mit assoziierter gestörter T-Zellentwicklung, da alle Nachkommen von dysgammaglobulinämischen Eltern, die über den Zeitraum der ersten Lebenswochen hinaus keimfrei gehalten wurden, nach dem Transfer in eine konventionelle Umgebung normale IgG-Spiegel entwickeln. Hohe Isotyp-spezifische Suppression als alleinige Ursache für den IgG-Mangel ist auszuschließen. Wahrscheinlich geht mit der Reifungsverzögerung der B-Zellen auch ein Defekt der B-Zellrezeptoren einher. Die zusätzlich auftretende Erhöhung der XDH-Aktivität und die

veränderte Qualität des Enzyms in den Lymphozyten führt ihrerseits zu einem erhöhten Purin- und Pteridinkatabolismus. Die verringerte Biopterin bzw. Tetrahydrobiopterinkonzentration in DYS-Lymphozyten kann eine verminderte positive Modulation der IL-2 Aktivität und damit eine geringere clonale Expansion der T-Helferzellen zur Folge haben. Möglicherweise betrifft diese Veränderung besonders die B_G-Zellen, die durch ihren geringeren Reifungsgrad besonders auf T-Helfersignale angewiesen sind.

Lösch et al. 1982 und Kühlmann-Rabens et al. 1986 schlossen aus Immunisierungsversuchen mit verschiedenen Antigenen auf eine defekte T-Zellhilfe bzw. einen defekten T-Zellfaktor bei dysgammaglobulinämischen Hühnern. Die vorübergehende Synthese von IgG bei circa 50% der DYS-Hühner nach Verabreichung von Levamisol, einem Immunmodulator mit Thymosin-ähnlichen Eigenschaften, zeigte die Beteiligung des T-Helfer-Systems an dem Immundefekt der UM-B19 Hühnerlinie.

Somit wird durch eine genetisch bedingte Veränderung des Bursamikroenvironments sowohl eine Isotyp-spezifische B-Zellreifungsverzögerung als auch eine veränderte XDH mit erhöhter Aktivität hervorgerufen. Beide Phänomene können die T-Zellentwicklung bzw. die Aktivität von Interleukin 2 beeinflussen und somit verminderte T-Zellhilfe zur Folge haben.

Zusammenfassung

In den vorliegenden in vitro Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Hühnerlinie wurden Kulturmethoden, zelluläre Aktivitäten, Purin- und Pteridinmetaboliten sowie die Xanthindehydrogenase untersucht.

Am Anfang der Arbeit wurde ein für das Huhn modifiziertes in vitro Kultursystem etabliert.

Die in vitro meßbaren Parameter der zellulären Immunität, wie Lymphozytenstimulierbarkeit durch Mitogene, Stimulationsfähigkeit getrennter B- und T-Zellen, Verhalten in der Kokultur und Wirkung von 6-Tage Kulturüberständen auf den ^3H -Thymidin-Einbau ergaben, daß periphere Blutlymphozyten von Hühnern mit den Mitogenen PWM und ConA dosisabhängige Stimulation aufweisen, wobei DYS-Lymphozyten mit PWM die maximale Antwort erst bei einer höheren Konzentration erreichen. Außerdem wurde die Notwendigkeit der B-T-Kooperation bei der mitogenen Antwort auf PWM nachgewiesen. Die verminderte proliferative Antwort der DYS-Lymphozyten auf ConA deutet auf eine Veränderung innerhalb der T-Population hin.

In den Kokultorexperimenten zeigten DYS-Lymphozyten keine supprimierende Wirkung auf die Überlebensrate und den ^3H -Tdr-Einbau sowie den Stimulationsindex von histokompatiblen normogammaglobulinämischen Lymphozyten. Kokultivierung von DYS-Lymphozyten mit T-Lymphozyten von NO-Hühnern resultierte in einem leichten Anstieg der Proliferationsrate. Auch die Zugabe von 6-Tage Kulturüberständen von stimulierten DYS-Zellen

verminderte die proliferative Antwort von KO-Lymphozyten nicht, sondern zeigte im Gegenteil einen signifikanten Anstieg des ^3H -Tdr-Einbaus.

Somit konnte eine hohe Suppressoraktivität der Lymphozyten dysgammaglobulinämischer Hühner als alleinige Ursache für den Immundefekt ausgeschlossen werden.

Auf Grund der positiven Wirkung der DYS-Überstände wurden Zellen, Kulturüberstände und Plasma untersucht. Es zeigte sich, daß DYS-Zellen bzw. ihre Kulturüberstände signifikante Konzentrationsveränderungen verschiedener Metaboliten des Pyrimidin-, Purin- und Pteridinstoffwechsels gegenüber Kontrollen aufwiesen. So lagen Uridin, Harnsäure und Isoxanthopterin in erhöhter Menge vor, während Hypoxanthin, Xanthin und Biopterin deutlich vermindert waren. Die Endprodukte des Purin- bzw. Pteridinstoffwechsels, Harnsäure bzw. Isoxanthopterin, konnten nur in den Kulturüberständen aber nicht in den Zellen nachgewiesen werden.

Auch im Plasma von DYS-Hühnern lagen Xanthin und Hypoxanthin signifikant vermindert vor, der Harnsäurespiegel war in beiden Tiergruppen gleich hoch.

Durch Zugabe von exogenem Hypoxanthin wurde die mitogene Stimulierung von Hühnerlymphozyten nicht beeinflusst.

Außerdem konnte durch Einbau von verschiedenen markierten Purin- bzw. Pyrimidinmetaboliten gezeigt werden, daß bei der mitogenen Stimulation aviärer Lymphozyten sowohl die Purin de novo Synthese als auch der salvage pathway erhöht ist.

Untersuchungen zum Hypoxanthinstoffwechsel in lebenden Lymphozyten ergaben keine Veränderungen der einzelnen apparenten Enzymaktivitäten in Lymphozyten immundefizienter Hühner.

Der Nachweis von Harnsäure und Isoxanthopterin in den Überständen war ein Hinweis für ein Xanthin-abbauendes Enzym. Untersuchungen an intakten Zellen erbrachten erstmals den Beweis für eine Xanthindehydrogenase-Aktivität in aviären Lymphozyten. Weiterhin bestätigte sich die Annahme, daß die Aktivität des Enzyms in DYS-Lymphozyten deutlich erhöht ist. Untersuchungen der apparenten kinetischen Größen K'_m und V'_{max} ergaben, daß die XDH in DYS-Zellen eine erhöhte Aktivität hat und von anderer Qualität ist (K'_m und V'_{max} erhöht).

Somit wird durch eine genetisch bedingte Veränderung des Bur-samikroenvironments sowohl eine Isotyp-spezifische B-Zellreifungsverzögerung als auch eine veränderte XDH mit erhöhter Aktivität hervorgerufen. Beide Phänomene können die T-Zellentwicklung bzw. die Aktivität von Interleukin 2 beeinflussen und somit verminderte T-Zellhilfe zur Folge haben.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALBINI, B. and WICK, G. (1974)
Delineation of B and T lymphoid cells in the chicken.
J.Immunol. 112, 444-450
- ALLISON, A.C., HOVI, T., WATTS, R.W.E. and WEBSTER, A.D.B. (1977)
The role of de novo purine synthesis in lymphocyte transformation.
In: Purine and Pyrimidine Metabolism. ed. Elliott, K. and Fitzimons, D.W., Ciba Foundation Symposium 48, pp.207-223
- ALMEIDA, J.D. and MORRIS, R. (1973)
Antigenically-related viruses associated with infectious bursal disease.
J.gen.Virol. 20, 369-375
- AMBROSIUS, H. and HÄDGE, D. (1982)
A phylogenetic view of avian immunology.
Folia biol.(Praha) 28, 1-21
- AMMANN, A.J. (1979)
Immunological aberrations in purine nucleoside phosphorylase deficiencies.
In: Enzyme Defects and Immune Dysfunction, Ciba Foundation Symposium 68, Excerpta Medica Amsterdam, pp.55-69
- ASTALDI, A., ASTALDI, G.C.B., WIJERMANS, P., GROENEWOUD, M., SCHELLEKENS, P.T.A. and EIJSVOOGEL, V.P. (1977)
Thymosin-induced human serum factor increasing cyclic AMP.
J.Immunol. 119, 1106-1108
- ATWATER, J.S. and TOMASI, T.B. (1978)
Suppressor cells and IgA deficiency.
Clin.Immunol.Immunopathol. 9, 379-384
- BAILEY, J.M., BRYANT, R.W., PUPILLO, M.B. and VANDERHOEK, J.Y. (1982)
Regulation of T-lymphocyte mitogenesis by the leucocyte product 15-hydroxy-eicosate-traenoic acid (15-HETE).
Cell.Immunol. 67, 112-120
- BAKER, J.K., SKELTON, R.E. and MA, C-Y. (1979)
Identification of drugs by high-pressure liquid chromatography with dual wavelength ultraviolet detection.
J.Chromatogr. 168, 417-427

- BARANKIEWICZ, J. and COHEN, A. (1985)
Purine nucleotide metabolism in resident and activated rat macrophages in vitro.
Eur.J.Immunol. 15, 627-631
- BATTELLI, M.G., DELLA CORTE, E. and STIRPE, F. (1972)
Xanthine oxidase typ D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat.
Biochem.J. 126, 747-749
- BENEDICT, A.A., ABPLANALP, H.A., POLLARD, L.W. and TAM, L.Q. (1977)
Inherited immunodeficiency in chickens: A model for common variable hypogammaglobulinemia in man?
Adv.Exp.Med.Biol. 88, 197-205
- BENEDICT, A.A., TAM, L.Q., CHANH, T.C., POLLARD, L.W., ABPLANALP, H. and GERSHWIN, M.E. (1980)
Inherited 7S immunoglobulin deficiency in chickens: Late onset dysgammaglobulinemia and evaluation of the lymphocyte proliferative responses and other immunologic functions.
Clin.Immunol.Immunopathol.17, 1-14
- BENEDICT, A.A., GERSHWIN, M.E. and ABPLANALP, H. (1981)
Inherited dysgammaglobulinemia of chickens.
In: Immunologic Defects in Laboratory Animals Vol.1, ed.M.E.Gershwin and B.Merchant, Plenum Publishing Cooperation pp.139-161
- BERGMAYER, H.U. (1973)
Standardization of the reaction temperature for the determination of enzyme activity.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 39-45
- BERNHEIM, J.L., DORIAN, R.E. and MENDELSON, J. (1978)
DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes in vitro. I. Cell kinetics of response to phytohemagglutinin.
J.Immunol. 120, 955-962
- BISMUTH, G., THUILLIER, L., PERIGNON, J.L. and CARTIER, P.H. (1982)
Uridine as the only alternative to pyrimidine de novo synthesis in rat T lymphocytes.
FEBS letters 148, 135-139
- BLAESE, R.M., WEIDEN, P.L., KOSKI, I. and DOOLEY, N. (1974)
Infectious agammaglobulinemia: transmission of immunodeficiency with grafts of agammaglobulinemic cells.
J.Exp.Med. 140, 1097-1101

BLAESE, R.M., MUCHMORE, A.V., KOSKI, I. and DOOLEY, N.J. (1977)

Infectious agammaglobulinemia: Suppressor T cells with specificity for individual immunoglobulin classes.

Adv.Exp.Med.Biol. 88, 155-159

BÖHRINGER, D., PIACENZA, C., LÖSCH, U. und MERKENSCHLAGER, M. (1983)

Erythrozyten-Antikörper-Rosettentest beim erblich dysgammaglobulinämischen und normogammaglobulinämischen Huhn.

Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 96, 217-221

BÖYUM, A. (1968)

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.

Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, suppl.97, 77-89

BROOM, B.C., DE LA CONCHA, E.G., WEBSTER, A.D.B., JANOSSY, G.J. and ASHERON, G.L. (1976)

Intracellular immunoglobulin production in vitro by lymphocytes from patients with hypogammaglobulinaemia and their effect on normal lymphocytes.

Clin.exp.Immunol. 23, 73-77

BROWN, G.W., BROWN, W.R. and COHEN, P.P. (1959)

Comparative biochemistry of urea synthesis. II. Levels of urea cycle enzymes in metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles.

J.biol.Chem. 234, 1775-1780

BROWN, G.M. (1971)

The biosynthesis of pteridines.

Adv.Enzymol. 35, 35-77

BROWN, P.R., BOBICK, S. and HANLEY, F.L. (1974)

The analysis of purine and pyrimidine bases and their nucleosides by high-pressure liquid chromatography.

J.Chromatogr. 99, 587-595

BRUDER, G., HEID, H., JARASCH, E-D., KEENAN, T.W., and MATHER I.H. (1982)

Characteristics of membrane-bound and soluble forms of xanthine oxidase from milk and endothelial cells of capillaries.

Biochim.Biophys.Acta. 701, 357-369

BRUDER, G., HEID, H.W., JARASCH, E-D. and MATHER, I.H. (1983)

Immunological identification and determination of xanthine oxidase in cells and tissues.

Differentiation 23, 218-225

BRÜGGEMANN, J., MERKENSCHLAGER, M., KIRCHNER, B. and LÖSCH, U. (1967)

Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn. Naturwissenschaften 54, 1-2

BRÜGGEMANN, J., FRIEDRICH, B. and LÖSCH, U. (1969)

Vergleichende Bestimmungen der Immunglobulin-Spiegel genuin dysgammaglobulinämischer und "hormonell bursektomierter" Hühner.

Ztr.Tierphysiol.Tierern.Futterm. 24, 317-330

BRÜGGEMANN, J., FRIEDRICH, B., LÖSCH, U. and SCHMID, D.O. (1971)

Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner. I. Isohämagglutinine.

Z.Immun.Forsch. 141, 280-289

BRYANT, B.J., ADLER, H.E., CORDY, D.R., SHIFRINE, M. and DaMASSA, A.J. (1973)

The avian bursa-independent humoral immune system; serologic and morphologic studies.

Eur.J.Immunol. 3, 9-15

CARSON, D.A. and SEEGMILLER, J.E. (1976)

Effect of adenosine deaminase inhibition upon human lymphocyte blastogenesis.

J.clin.Invest. 57, 274-282

CARSON, D.A., KAYE, J. and WASSON, D.B. (1981)

The potential importance of soluble deoxynucleotidase activity in mediating deoxyadenosine toxicity in human lymphoblasts.

J.Immunol.126, 348-352

CATIGNANI, G.L., CHYTIL, F. and DARBY, W.J. (1974)

Vitamin E deficiency: immunochemical evidence for increased accumulation of liver xanthine oxidase.

Proc.nat.Acad.Sci.(Wash) 71, 1966-1968

CHANH, T.C., BENEDICT, A.A., TAM, L.Q., ABPLANALP, H. and GERSHWIN, M.E. (1980)

Inherited 7S immunoglobulin deficiency in chickens: presence of suppressor T cells that suppress synthesis of 7S immunoglobulin but not IgM.

J.Immunol. 125, 108-114

CHEVILLE, N.F. (1967)

Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of the chicken.

Amer.J.Path. 51, 527-551

CHOI, Y.S., BIGGAR, W.D. and GOOD, R.A. (1972)
Biosynthesis and secretion of immunoglobulins by peripheral
blood lymphocytes in severe hypogammaglobulinaemia.
Lancet, I, 1149-1152

CLAASSEN, V.P., OLTMANN, L.F., BETTENHAUSSEN, C.W., STOUT-
HAMER, A.H., VAN T RIET, J., PINKSE, F.A., FOKKENS, R.H.
and NIBBERING, N.M.M. (1984)
Mass spectrometric analysis of fluorescent products originating
from the molybdenum cofactor.
Biochem.Int. 8, 127-134

CLEVE, H. und LEHMANN, W. (19)
Primäre Immundefekte
In: Humangenetik, Bd.III/3, ed. Becker, pp. 419-456

COHEN, A., DOYLE, D., MARTIN, D.W. and AMMANN, A.J. (1976)
Abnormal purine metabolism and purine overproduction in a
patient deficient in purine nucleoside phosphorylase.
N.Engl.J.Med. 295, 1449-1454

COOPER, M.D., PETERSON, R.D.A., SOUTH, M.A. and GOOD,
R.A. (1966)
The functions of the thymus system and the bursa system in
the chicken.
J.Exp.Med. 123, 75-103

COOPER, M.D., LAWTON, A.R. and BOCKMAN, D.E. (1971)
Agammaglobulinemia with B lymphocytes. Specific defect of plas-
ma cell differentiation.
Lancet, II, 791-794

COOPER, M.D., LAWTON, A.R. and KINCADE, P.W. (1972)
A two-stage model for development of antibody-producing cells.
Clin.Exp.Immunol. 11, 143-149

COOPER, M.D. and LAWTON, A.R. (1974)
The development of the immune system.
Sci.Am. 231, 58

COOPER, M.D., PURCHASE, H.G., BOCKMAN, D.E. and GATHINGS,
W.E. (1974)
Studies on the nature of the abnormality of B cell differentia-
tion in avian lymphoid leukemia: production of heterogenous
IgM by tumour cells.
J.Immunol. 113, 1210-1222

- COUGHLAN, M.P., BETCHER-LANGE, S.L. and RAJAGOPALAN, K.V. (1979)
Isolation of the domain containing the molybdenum, iron-sulfur I and iron-sulfur II centers of chicken liver xanthine dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 254, 10694-10699
- COUTINHO, A., MÖLLER, G., ANDERSSON, J. and BULLOCK, W.W. (1973)
In vitro activation of mouse lymphocytes in serum free-medium: Effect of T and B cell mitogens in proliferation and antibody synthesis.
Eur.J.Immunol. 3, 299-306
- DIETERLEN-LIEVRE, F., MARTIN, C. and BEAUPAIN, D. (1977)
Origin of erythropoietic and lymphopoietic stem cells in the avian embryo, studied in interspecific chimaeras.
Folia biologica (Praha) 23, 373-375
- DORN, W. (1984)
Quantitative Untersuchungen der Polymeren und Monomeren Anteile von IgM und IgA beim Haushuhn.
Dissertation, Universität München
- DROEGE, W. (1976)
The antigen-inexperienced thymic suppressor cells: a class of lymphocytes in the young chicken thymus that inhibits antibody production and cell-mediated immune responses.
Eur.J.Immunol. 6, 279-287
- DUMONDE, D.C., WOLSTENCROFT, R.A., PANAYI, G.S., MATTHEW, M., MORLEY, J. and HOWSON, W.T. (1969)
"Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature 224, 38-42
- DUTTON, R.W. (1965)
Further studies of the stimulation of DNA synthesis in cultures of spleen cell suspension by homologous cells in inbred strains of mice and rats.
J.Exp.Med. 122, 759-770
- EDWARDS, N.L., GELFAND, E.W., BURK, L., DOSCH, H.M. and FOX, I.H. (1979)
Distribution of 5 nucleotidase in human lymphoid tissues.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 76, 3474-3476
- EIJSSVOOGEL, V.P., van ROOD, J.J., du TOIT, E.D. and SCHELLEKENS, P.T.A. (1972)
Position of a locus determining mixed lymphocyte reaction distinct from the known HL-A loci.
Eur.J.Immunol. 2, 413-418

ENGELMAN, K., WATTS, R.W.E., KLINENBERG, J.R., SJOERDSMA, A. and SEEGMILLER, I.E. (1964)
Clinical, physiological and biochemical studies of a patient with Xanthinuria and Pheochromocytoma.
Am.J.Med. 37, 839-861

ESKOLA, J. and TOIVANEN, P. (1974)
Effect of in ovo treatment with cyclophosphamide on lymphoid system in chicken.
Cell.Immunol. 13, 459-471

ESKOLA, J. and TOIVANEN, A. (1976)
Cell transplantation into immunodeficient chicken embryos. Reconstituting capacity of cells from the Bursa of Fabricius, spleen, bone marrow, thymus and liver of 18-day-old embryos.
Cell.Immunol. 26, 68-77

EVANS, G.H. and IVANYI, J. (1974)
In vitro response of chicken spleen cells to sheep red blood cells.
Cell.Immunol. 14, 402-410

FABRICIUS, H. (1621)
De formatione ovi et pulli tractus accuratissimus.
Patavii, ex officina Aloysij Bencij bibliopolae
zitiert nach Jancovic, B.D. 1968

FARRAR, J.J., BENJAMIN, W.R., HILFIKER, M.L., HOWARD, M., FARRAR, W.L. and FULLER-FARRAR, J (1982)
The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses.
Immunol.Rev. 63, 129-166

FEIGELSON, Ph., ULTMANN, J.E., HARRIS, S. and DASHMAN, Th. (1959)
Cellular xanthine oxidase and uricase levels in leukemic and normal mouse leukocytes.
Cancer Res. 19, 1230-1233

FELDMANN, M. and NOSSAL, G.V.J. (1972)
Tolerance, enhancement and the regulation of interactions between T cells, B cells and macrophages.
Transpl.Rev. 13, 3-34

FIEDLER, H., LÖSCH, U., HALA, K. (1980)
Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinaemia and dysgammaglobulinaemia (IgM/IgG).
Fol.biol.(Praha) 26, 17-25

- FIEDLER, H., SCHEU, M., KÜHLMANN-RABENS, I. and LÖSCH, U. (1981)
Kinetics of delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions and Ig levels in FCA-injected dysgammaglobulinemic B 12 chickens. Immunobiol. 158, 293-302
- FILIPOVICH, A.H. and KERSEY, J.H. (1983)
B-lymphocyte function in immunodeficiency disease. Immunol.Today 4, 50-55
- FINK, M., JEHN, U., WILMANN, W., ROKOS, H. and ZIEGLER, I. (1983)
Neopterin in plasma and urine and bioppterin in blood fractions after bone marrow transplantation.
In: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines. Curtius, M. CH., Pfeleiderer, W. and Wachter, H., eds. W.de Gruyter Berlin p.223-234
- FISHER, D.B. and MUELLER, G.C. (1968)
An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytohemagglutinin.
Proc.nat.Acad.Sci.(Wash) 60, 1396-1402
- FLEISCHER, B. (1980)
Effector cells in avian spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
J.Immunol. 125, 1161-1165
- FLEISCHER, B. (1981)
The avian immune system.
Immunol.Today, Oktober, 195-200
- FORREST, H.S., GLASSMAN, E. and MITCHELL, H.K. (1956)
Conversion of 2-amino-4-hydroxypteridine to isoxanthopterin in D. Melanogaster.
Science 124, 725-726
- FORSDYKE, D.R. (1973)
Serum factors affecting the incorporation of ^3H -thymidine by lymphocytes stimulated by antigen. I. Serum concentration.
J.Immunol. 25, 583-595
- FROMM, H.J. (1975)
Initial rate enzyme kinetics.
Springer, Berlin

FU, S.M., HURLEY, J.N., McCUNE, J.M., KUNKEL, H.G. and GOOD, R.A. (1980)

Pre-B cells and other possible precursor lymphoid cell lines derived from patients with X-linked agammaglobulinemia. J.Exp.Med. 152, 1519-1526

FUCHS, D., HAUSEN, A., HUBER, Chr., MARGREITER,, R., REIB-NEGGER,G., SPIELBERGER, M. and WACHTER, H. (1982)

Pteridinausscheidung als Marker für alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, 661-664

FUDENBERG, H.H., GERMAN, J.L. and KUNKEL, H.G. (1962)

The occurrence of rheumatoid factor and other abnormalities in families of patients with agammaglobulinemia. Arthr.Rheum. 5, 565-588

FUDENBERG, H.H., HEREMANS, J.F. and FRANKLIN, E.C. (1963)

A hypothesis for the genetic control of synthesis of the gamma-globulins. Ann.Inst.Pasteur 104, 155-168

FUDENBERG, H.H., GOOD, R.A., HITZIG, W., KUNKEL, H.G., ROITT, I.M., ROSEN, F.S., ROWE, D.S., SELIGMANN, M., SOOT-HILL,J,R. (1970)

Classification of the primary immune deficiencies. WHO recommendation. New.Engl.J.Med. 283, 656-657

FUKUSHIMA, T. and NIXON, J.C. (1979)

Oxidation and conversion of reduced forms of biopterin.

In: Biochemistry and Biology of Pteridines. ed. Kisliuk, R.L., Brown, G.M., Elsevier/North Holland, New York-Amsterdam-Oxford pp.31-34

GEHA, R.S., SCHNEEBERGER, E., MERLER E. and ROSEN F.S. (1974)

Heterogeneity of "aquired or common variable agammaglobulinemia".

New.Engl.J.Med. 291, 1-6

GIBBS, D.A., ALLSOP, J. and WATTS, R.W.E. (1976)

The absence of xanthine oxidase (EC 1.2.3.2) from a xanthinuric patient's milk.

J.Mol.Med. 1, 167-170

GIBLETT, E.R., ANDERSON, J.E., COHEN, F., POLLARA, B. and MEUWISSEN, H.J. (1972)
Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity.
Lancet. II, 1067-1069

GLICK, B., CHANG, T.S., JAAP, R.G. (1956)
The bursa of Fabricius and antibody production.
Poultry Sci. 35, 224-225

GLICK, B. and SADLER, C.R. (1961)
The elimination of the Bursa of Fabricius and reduction of antibody production in birds from eggs dipped in hormone solution.
Poultry science 40, 185-189

GLICK, B. (1977)
The Bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis.
Int.Rev.Cytol. 48, 345-402

GOOD, R.A. (1954)
Agammaglobulinemia: an experimental study.
Am.J.Dis.Child. 88, 625-626

GOOD, R.A., DALMASSO, A.P., MARTINEZ, C., ARCHER, O.K., PIERCE, J.C. and PAPERMASTER, B.W. (1962)
The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice.
J.Exp.Med. 116, 773-795

GOODMAN, M.G. and WEIGLE, W.O. (1977)
Nonspecific activation of murine lymphocytes. I. Proliferation and polyclonal activation induced by 2-mercaptoethanol and α -thioglycerol.
J.Exp.Med. 145, 473-489

GREAVES, M.F., ROITT, I.M, and ROSE, M.E. (1968)
Effect of bursectomy and thymectomy on the responses of chicken peripheral blood lymphocytes to phytohaemagglutinin.
Nature 220, 293-295

GREBENAU, M.D., LERMAN, S.P., PALLADINO, M.A. and THOR-BECKE, G.J. (1976)
Suppression of adoptive antibody responses by addition of spleen cells from agammaglobulinemic chickens "immunized" with histocompatible bursa cells.
Nature 260, 46-48

- CHILDSWALL, M.D. and THOMPSON, G.J. (1978).
T cell markers in the chorion. I. Parameters affecting tolerance induction to human γ -globulin in agammaglobulinemic and normal chorion.
J.Immunol. 120, 1468-1473.
- CHISH, H. and CHAN, T.S. (1973).
Pyrimidine starvation induced by adenovine in fibroblasts and lymphoid cells: Role of adenovine deaminase.
Virus 52, 838-841.
- CHWASI, C.E., LIDKARD, P.M. and COOPER, M.D. (1977).
Changes in the expression of the gamma 2 heavy chain of cytoplasmic IgM expression and of modulation requirements for surface IgM in cells.
J.Immunol. 119, 749-756.
- HAHL, J.G. (1962).
Adenovine deaminase activity in lymphoid cells during antibody synthesis.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 31-37.
- HALPERN, B., HALPERN, B.C., STEA, B., DUNLAP, A., CONKLIN, K., CLARK, B., ASHE, H., SPERLING, L., HALPERN, J.A., HARRY, D. and SMITH, S.A. (1977).
Pleuro-Epithelioma, a cancer cell character: identification and application in diagnosis and treatment of human cancer.
Proc.Nat.Acad.Sci.(U.S.A.) 74, 587-591.
- HAUSMAN, A. (1964).
Untersuchungen über die Fertilität dysgammaglobulinämischer Mäuse der JM-519 Linie.
Dissertation, Universität München.
- HARRIS, S.E. and FORREST, H.S. (1967).
Inhibition of cancer growth by antibodies of mouse and DNA synthesis in developing embryonic eggs.
Proc.Nat.Acad.Sci.(U.S.A.) 62, 25-28.
- HARTIG, J., JONAS, J., KARLBERG, K., JONAS, H. and JONAS, K. (1971).
A case of severe immunodeficiency: analysis of cellular and humoral components of the immune system.
Scand.J.Immunol. 1, 20-25.
- HAUSEN, A. and WACHTER, M. (1962).
Pleuro-Epithelioma in the treatment of neoplasia.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 20, 593-602.

- HAWKINS, R.A. and BERLIN, R.D. (1969)
Purine transport in polymorphonuclear leukocytes.
Biochim.Biophys.Acta 173, 324-337
- HAYARI, Y., SCHAUENSTEIN, K. and GLOBERSON, A. (1982)
Avian lymphokines II: Interleukine-1 activity in supernatants
of stimulated adherent splenocytes of chickens.
Dev.Comp.Immunol. 6, 785-789
- HAYWARD, A.R. and GREAVES, M.F. (1975)
Central failure of B-lymphocyte induction in pan-hypogammaglobulinaemia.
Clin.Immunol.Immunopath. 3, 461-470
- HEMMINGSSON, E.J. (1972)
Ontogenetic studies on lymphoid cell traffic in the chicken.
III. Cell traffic from the thymus.
Int.Archs.Allergy appl.Immun. 43, 481-496
- HENDERSON, J.F. (1972)
Regulation of purine biosynthesis.
Wash.Amer.Chem.Soc. 252-256
- HENDERSON, J.F., FRASER, J.H. and Mc COY, E.E. (1974)
Methods for the study of purine metabolism in human cells
in vitro.
Clin.Biochem. 7, 339-358
- HERLYN, D., BOHNER, J. and LÖSCH, U. (1977)
IgG turnover in dysgammaglobulinemic chickens.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 1169-1172
- HIRAI, K., SHIMAKURA, S., KAWAMOTO, E., TAGUCHI, F., KIMS, T. and CHANG, C.N. (1974)
The immuno-depressive effect of infectious bursal disease virus
in chickens.
Avian Dis. 18, 50-57
- HIRANO, T., KURITANI, T., KISHIMOTO, T. and YAMAMURA, Y. (1977)
In vitro immune response of human peripheral lymphocytes.
I. The mechanism(s) involved in T cell helper functions in
the pokeweed mitogen-induced differentiation and proliferation
of B cells.
J.Immunol. 119, 1235-1241

- HIROTA, Y. and BITO, Y. (1974)
Diverse effects of bursectomy on humoral immune responses in the chicken.
Poultry Sci. 54, 1524-1538
- HIRSCHHORN, K. and HIRSCHHORN, R. (1974)
Mechanisms of lymphocyte activation.
In: Mechanisms of cell-mediated immunity. ed. McCluskey, R.T. and Cohen, S.; John Wiley and sons, Sidney, Toronto, pp.115-134
- HIRSCHHORN, R. and SELA, E. (1977)
Adenosine deaminase and immunodeficiency: An in vitro model.
Cell.Immunol. 32, 350-360
- HIRSCHHORN R. (1977)
Adenosine deaminase deficiency and immunodeficiencies.
Fed. Proceedings 36, 2166-2170
- HITCHINGS, G.H. (1978)
Uric Acid: Chemistry and synthesis.
In: Uric Acid. ed. Kelley, W.N. and Weiner, I.M, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 1-20
- HOFFELD, J.T. and OPPENHEIM, J. (1980)
Enhancement of the primary antibody response by 2-mercaptoethanol is mediated by its action on glutathione in the serum.
Eur.J.Immunol. 10, 391-395
- HOFFMANN-FEZER, G. and LADE, R. (1972)
Postembryonale Entwicklung und Involution der Bursa Fabricii beim Haushuhn (*Gallus domesticus*).
Z.Zellforsch. 124, 406-418
- HOFFMANN-FEZER, G. and LÖSCH, U. (1983)
Distribution of IgM-, IgG-, and IgA-positive cells in lymphatic organs of normo- and dysgammaglobulinemic UM-B19 chickens.
Int.Archs.Allergy appl.Immun. 70, 346-351
- HOFSTEE, B.H.J. (1949)
Inhibition of the enzymic oxidation of xanthine and xanthopterin by pteridines.
J.Biol.Chem. 179, 633-643
- HONG, R. and GOOD, R.A. (1967)
Limited heterogeneity of gamma globulin in hypogammaglobulinemia.
Science 156, 1102-1103

- HOVI, T., ALLISON, A.C., RAIVIO, K.O. and VAHERI, A. (1977)
Purine metabolism and control of cell proliferation.
In: Purine and Pyrimidine Metabolism. ed. Elliott, K. and
Fitzimons, D.W., Ciba Foundation Symposium 48, pp. 225-248
- HOVI, T., SUNI, J., HORTLING, L. and VAHERI, A. (1978)
Stimulation of chicken lymphocytes by T- and B-cell mitogens.
Cell.Immunol. 39, 70-78
- HUBER, C., FUCHS, D., HAUSEN, A., MARGREITER, R., REIBNEG-
GER, G., SPIELBERGER, M. and WACHTER, H. (1983)
Pteridines as a new marker to detect human T cells activated
by allogeneic or modified self major histocompatibility complex
(MHC) determinants.
J.Immunol. 130, 1047-1050
- HUDSON, L. and ROITT, I.M. (1973)
Immunofluorescent detection of surface antigens specific to T
and B lymphocytes in the chicken.
Eur.J.Immunol. 3, 63-67
- HURVITZ, A.I. (1974)
Monoclonal gammopathies.
In: Current Veterinary Therapy. ed. Kirk, R. 5th.ed, pp.372-374
Saunders Philadelphia, Pennsylvania.
- ITOH, R. and TSUSHIMA, K. (1974)
Comparisons of adaptations to diet of enzymes involved in uric
acid production from IMP in chickens and rats.
J.Biochem.75, 715-721
- IVANYI, J. and SALERNO, A. (1971)
Impairment of humoral antibody response in neonatally thymecto-
mized and irradiated chickens.
Eur.J.Immunol. 1, 227-230
- IVANYI, J. and SHAND, F.L. (1973)
In: Phylogeneic and ontogeneic study of the immune response
and its contribution to the immunological theory. Inserm, Paris
p. 191-200
- IVANYI, J. and MORRIS, R. (1976)
Immunodeficiency in the chicken. IV. An immunological study
of infectious bursal disease.
Clin.exp.Immunol. 23, 154-165
- JANKOVIC, B.D. and ISAKOVIC, K. (1966)
Antibody production in bursectomized chickens given repeated
injections of antigens.
Nature 211, 202-203

JANKOVIC, B.D. (1968)

The development and function of immunologically reactive tissue in the chicken.

Wiss.Ztr.Friedrich Schiller, Univ.Jena 17, 137-138

JANKOVIC, B.D., KNEZEVIC, Z., ISAKOVIC, K., MITROVIC, K., MARKOVIC, B.M. and RAJCEVIC, M. (1975)

Bursa lymphocytes and IgM-containing cells in chicken embryos bursectomized at 52-64 hours of incubation.

Eur.J.Immunol. 5, 656-659

JANOSSY, G. and GREAVES, M. (1975)

Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets.

Transplant.Rev. 24, 177-192

JOHNSON, J.L., HAINLINE, B.E., RAJAGOPALAN, K.V. and ARISON, B.H. (1984)

The pterin component of the molybdenum cofactor.

J.biol.Chem. 259, 5414-5422

JOHNSTON, J.M. and KREDICH, N.M. (1979)

Inhibition of methylation by adenosine in adenosine deaminase-inhibited phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes.

J.Immunol. 123, 97-103

JOTEREAU, F.V., HOUSSAINT, E. and LE DOUARIN, N.M. (1980)

Lymphoid stem cell homing to the early thymic primordium of the avian embryo.

Eur.J.Immunol. 10, 620-627

KALCKAR, H.M., KJELDGAARD, N.O. and KLENOW, H. (1950)

Xanthopterin oxidase.

Biochim.Biophys.Acta. 5, 575-585

KAMINSKY, Z.W. and JEZEWSKA, M.M. (1979)

Intermediate dehydrogenase-oxidase form of xanthine oxidoreductase in rat liver.

Biochem.J. 181, 177-182

KAUFMAN, S. and FISHER, D.B. (1962)

Pterin-requiring amino acid hydroxylases.

In: Oxigenases. O.Hayaishi (ed.) New York, Academic Press, Inc. p.285-370

KAUFMAN, S. (1979)

Biopterin and metabolic disease.

In: Chemistry and Biology of Pteridines, ed. Kisliuk, R.L. and Brown, G.M. Elsevier/North Holland, New York p.117-124

- al-KHALIDI, U.A.S. and CHAGLIASSIAN, T.H. (1965)
The species distribution of xanthine-oxidase.
Biochem.J. 97, 318-320
- KEIGHTLEY, R.G., COOPER, M.D. and LAWTON, A.R. (1976)
The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen.
J.Immunol. 117, 1538-1544
- KELLEY, M.K. and AMY, N.K. (1984)
Effect of molybdenum-deficient and low iron diets on xanthine oxidase activity and iron status in rats.
J.Nutr. 114, 1652-1659
- KINCADE, P.W., LAWTON, A.R., BOCKMAN, D.E. and COOPER, M.D. (1970)
Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody-mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 67, 1918-1925
- KINCADE, P.W. and COOPER, M.D. (1971)
Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken. An immunofluorescent analysis using purified antibodies to u, and light chains.
J.Immunol. 106, 371-382
- KINCADE, P.W. and COOPER, M.D. (1973)
Immunoglobulin A: Site and sequence of expression in developing chicks.
Science 179, 398-400
- KIRCHNER, H. and OPPENHEIM, J.J. (1972)
Stimulation of chicken lymphocytes in a serum-free medium.
Cell.Immunol.3, 695-699
- KIRCHNER, H. and BLAISE, R.M. (1973)
Pokeweed mitogen, Concanavalin A- and Phytohaemagglutinin-induced development of cytotoxic effector lymphocytes.
J.Exp.Med. 138, 812-824
- KNOX, W.E. and GREENGARD, O. (1965)
The regulation of some enzymes of nitrogen metabolism - an introduction to enzyme physiology
Advan.Enzyme Regulation 3, 247-313
- KOFER, R. and WICK, G. (1978)
Immunofluorescent localization of thyroglobulin autoantibody producing cells in various organs of Obese strain (OS) chickens.
Z.Immunitätsforsch.Immunobiol. 154, 88-93

KRENITSKY, T.A., NEIL, S.M., ELION, G.B. and HITCHINGS, G.H. (1972)

A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase.

Arch.Biochem.Biophys. 150. 585-599

KRENITSKY, T.A. and TUTTLE, J.V. (1978)

Xanthine oxidase activities: Evidence for two catalytically different types.

Arch.Biochem.Biophys. 185, 370-375

KÜHLMANN-RABENS, I., WANKE, R., STORANDT, F., ALTMANN, B., LÖSCH, U. and MERKENSCHLAGER, M. (1986)

Attempts on defect localisation in UM-B19 chickens by studying the effect of immunomodulation substances on immunoglobulin and antibody production.

Vet.Immunol.Immunopathol. (in press)

KUTTESCH, J.F., SCHMALSTIEG, F.C. and NELSON, J.A. (1978)

Analysis of adenosine and other adenine compounds in patients with immunodeficiency diseases.

J.Liq.Chromatogr. 1, 97-109

LASSILA, O. (1981)

Embryonic differentiation of lymphoid stem cells.

In: Developmental and comparative Immunology, Vol. 5, Pergamon Press Ltd, USA pp. 403-414

LASSILA, O. MARTIN, C., DIETERLEN-LIEVRE, F., GILMOUR, D.G., ESKOLA, J., TOIVANEN, P. (1982)

Migration of prebursal stem cells from the early chicken embryo to the yolk sac.

Scand.J.Immunol. 16, 265-268

LAWTON, A.R., KINCADE, P.W. and COOPER, M.D. (1975)

Sequential expression of germ line genes in development of immunoglobulin class diversity.

Fed.Proc. 34, 33-39

LEBACQ, A.M. (1979)

Purification and testing of class-specific anti-chicken immunoglobulin antibodies.

J.Immunol.Methods 25, 101-117

LEE, P.C. (1973)

Developmental changes of adenosine deaminase, xanthine oxidase and uricase in mouse tissues.

Dev.Biol. 31, 227-233

LEE, L.L. (1974)

In vitro assay of mitogen stimulation of avian peripheral lymphocytes.

Avian Dis. 18, 602-609

LE DOUARIN, N.M., JOTEREAU, F.V., HOUSSAINT, E. and BELO, M. (1976a)

Ontogeny of the avian thymus and bursa of Fabricius studied in interspecific chimeras.

Ann.Immunol.Pasteur. 127 C, 849-856

LE DOUARIN, N.M., JOTEREAU, F.V. and HOUSSAINT, E. (1976b)

The lymphoid stem cells in the avian embryo.

In: Phylogeny of thymus and bone marrow-bursa cells. ed. Wright, R.K. and Cooper, E.L.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands pp.217-223

LERMAN, S.P. and WEIDANZ, W.P. (1970)

The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens.

J.Immunol. 105, 614-619

LERNER, K.G., GLICK, B. and McDUFFIE, F.C. (1971)

Role of the bursa of fabricius in IgG and IgM production in the chicken: Evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity.

J.Immunol. 107, 493-503

LESLIE, G.A. and CLEM, L.W. (1969)

Phylogeny of immunoglobulin structure and function.III. Immunoglobulins of the chicken.

J.Exp.Med.130, 1337-1352

LESLIE, G.A. (1975)

Ontogeny of the chicken humoral immune mechanism.

Am.J.Vet.Res. 36, 482-485

LÖSCH, U. (1972)

Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie.

Habilitationsschrift, Universität München

LÖSCH, U., HARTMANN, W. und RIEDEL, G. (1972)

Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner. II. Präzipitierende Antikörper (Anti-HSA)

Z.Immun.Forsch.143, 16-30

LÖSCH, U. and HOFFMANN-FEZER, G. (1973)

Vergleichende histologische und immunologische Untersuchungen an immunologisch defekten Hühnern. II. Genuin dysgammaglobulinämische Hühner.

Zentbl.Vet.Med.A. 20, 596-605

LÖSCH, U., KÜHLMANN, I., KLUMPNER, W. and FIEDLER, H. (1981)

Course of serum-Ig concentration in B 12 chickens of the UM line.

Immunobiol. 158, 416-425

LÖSCH, U., WANKE, R. und MERKENSCHLAGER, M. (1982)

Antikörper-Isotypen nach Immunisierung genuin dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner.

Zbl.Vet.Med.A. 29, 365-374

LOOR, F. (1974)

Binding and redistribution of lectins on lymphocyte membrane.

Eur.J.Immunol. 4, 210-220

LOWRY, O.H., BESSEY, O.A. and CRAWFORD, E.J. (1949)

Pterine oxidase.

J.Biol.Chem. 180, 399-410

LUSTER, M.I., BACON, L.D., ROSE, N.R. and LESLIE, G.A. (1977)

Immunogenetic and ontogenetic studies of chickens with selective IgA deficiency and autoimmune thyroiditis.

Cell.Immunol.32, 417-423

MANCINI, G., CARBONARA, O. and HEREMANS, J.F. (1965)

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.

Immunochem. 2, 235-254

MARCOLONGO, R., MARINELLO, E., POMPUCCI, G. and PAGANI, R. (1974)

The role of xanthine oxidase in hyperuricemic states.

Arthr. and Reum. 17, 430-438

MARTIN, L.N. and LESLIE, G.A. (1973)

Ontogeny of IgA in normal and neonatally bursectomized chickens, with corroborative data on IgY and IgM.

Proc.Soc.Exp.Biol. 143, 241-243

MARTIN, L.N. and LESLIE, G.A. (1974)

IgM-forming cells as the immediate precursor of IgA-producing cells during ontogeny of the immunoglobulin-producing system of the chicken.

J.Immunol 113, 120-126

- MATTSSON, A. and LINDAHL-KIESSLING, K. (1971)
Lymphocyte culture in serum-free medium.
Lancet, I, 704
- MC ARTHUR, W.P., GILMOUR, D.G. and THORBECKE, G.J. (1973)
Immunocompetent cells in the chicken II: Synergism between thymus cells and either bursa or bone marrow cells in the humoral immune response to sheep erythrocytes.
Cell.Immunol 8, 103-111
- McFARLAND, D.C. and COON, C.N. (1980)
Purine metabolism studies in the High and Low uric acid containing lines of chickens: De novo uric acid synthesis and xanthine dehydrogenase activities.
Poult.Sci. 59, 2250-2255
- McGUIRE, T.C. and POPPIE, M.J. (1973)
Hypogammaglobulinemia and thymic hypoplasia in horses: A primary combined immunodeficiency disorder.
Infect.Immunity 8, 272-277
- McKUSICK, V.A. and RUDDLE, F.H. (1977)
The status of the gene map of the human chromosome.
Science 196, 390-404
- MELCHERS, F., COUTINHO, A., HEINRICH, G. and ANDERSSON, J. (1975)
Continuous growth of mitogen-reactive B-lymphocytes.
Scand.J.Immunol. 4, 853-858
- MENDELSON, J., SKINNER, A. and KORNFELD, S. (1971)
A rapid induction by phytohaemagglutinin of increased α -aminoisobutyric acid uptake by lymphocytes.
J.clin.Invest. 50, 818-826
- MEYER, R.K., RAO, M.A. and ASPINALL, R.L. (1959)
Inhibition of the development of the bursa of Fabricius in the embryos of the common fowl by 19-nortestosterone.
Endocrinol. 64, 890-897
- MILLER, J.F.A.P. (1961)
Immunological function of the thymus.
Lancet II, 748-749

- MILLER, J.F.A.P. (1963)
Origins of immunological competence.
Brit.Med.Bulletin 19, 214-218
- MILLER, J.F.A.P. (1965)
Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness.
Nature.Lond.208, 1337-1338
- MILLER, J.F.A.P. and OSOBA, D. (1967)
Current concepts of the immunological function of the thymus.
Physiol.Rev. 47, 437-520
- MONTERO, J., GERSHWIN, M.E., EKLUND, J., ABPLANALP, H., ERICKSON, K., TAM, L., BENEDICT, A.A. and IKEDA, R.M. (1979)
Autoimmune manifestations of selective 7S immunoglobulin deficiency of chickens.
Clin.Immunol.Immunopathol. 14, 334-347
- MORGAN E.J. (1926)
The distribution of xanthine oxidase I.
Biochem.J. 20, 1282-1291
- MORGAN, E.J. (1930)
Xanthine oxidase in the avian embryo.
Biochem.J. 24, 410-414
- MOTICKA, E.J. (1977)
The presence of immunoregulatory cells in the chicken thymus: Function in T and B cell responses.
J.Immunol. 119, 987-992
- MUELLER, A.P., WOLFE, H.R., MEYER, R.K. and ASPINALL, R.L. (1962)
Further studies on the role of the bursa of Fabricius in antibody production.
J.Immunol. 88, 354-360
- MÜLLER, M.M., PISCHEK, G., SCHEINER, O., STEMBERGER, H. and WIEDERMANN, G. (1980)
Adenine and hypoxanthine metabolism in phytohemagglutinin-stimulated and unstimulated human lymphocytes.
Blut 40, 137-145

MURISON, G. (1969)

Synthesis and degradation of xanthine dehydrogenase during chick liver development.

Dev.Biol. 20, 518-543

NATT, M.P. and HERRICK, Ch.A. (1952)

A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken.

Poultry Sci. 31, 735-738

NELSON, J.A. and CSERR, H.F. (1976)

Transport and metabolism of purines by isolated choroid plexus, liver and brain in the spiny dogfish, *squalus acanthias*.

Comp.Biochem.Physiol. 53B, 371-377

NISHIDA, Y., OKUDAIRA, K., TANIMOTO, K. and AKAOKA, I. (1980)

The differences in purine metabolism between T and B lymphocytes.

Exp.Hemat. 8, 593-598

NURMI, T., UHARI, M., LINNA, S.L., HERVA, R., TILIKAINEN, A. and KOUVALAINEN, K. (1981)

Immunodeficiency associated with a deletion in the short arm of the X-chromosome.

Clin.Exp.Immunol. 45, 107-112

OBERDORFER, A. und LÖSCH, U. (1970)

Das sedimentationsanalytische Serumweißbild dysgammaglobulinämischer Hühner (*Gallus domesticus*).

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 1007-1010

OLIVER, J.M., GELFAND, E.W., PEARSON, C.B., PFEIFFER, J.R. and DOSCH, H-M. (1980)

Microtubule assembly and concanavalin A capping in lymphocytes: Reappraisal using normal and abnormal human peripheral blood cells.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 3499-3503

OPITZ, H.G., OPITZ, U., LEMKE, H., HEWLETT, G., SCHREML, W. and FLAD, H.D. (1977)

The role of fetal calf serum in the primary immune response in vitro.

J.exp.Med. 145, 1029-1038

- OPPENHEIM, J.J. and ROSENSTREICH, D.L. (1976)
"Mitogens in Immunobiology"
New York: Academic Press
- PAHWA, S.G., HOFFMAN, M.K., PAHWA, R.N. and GOOD, R.A. (1982)
Polyclonal and antigen-specific B-cell responses in patients with common variable immunodeficiency.
J.Clin.Immunol. 2, 205-213
- PANTELOURIS, E.M. (1968)
Absence of thymus in mouse mutant.
Nature, 217, 370-371
- PARKER, W.C. and BEARN, A.G. (1963)
Application of genetic regulatory mechanisms to human genetics.
Am.J.Med. 34, 680-691
- PARKER, N.F., JACK, I. and VAN DER WEYDEN, M.B. (1982)
Adenosine and deoxyadenosine-mediated altered pyrimidine metabolism in human adenosine deaminase-deficient lymphoblasts.
J.Lab.Clin.Med. 99, 731-739
- PARKHOUSE, R.M.E. and COOPER, M.D. (1977)
A model for the differentiation of B lymphocytes with implications for the biological role of IgD.
Immun.Rev. 37, 105-126
- PEARL, E.,R., VOGLER, L.B., OKOS, A.J., CRIST, W.M., LAWTON, A.R., and COOPER, M.D. (1978)
B lymphocyte precursors in human bone marrow. An analysis of normal individuals and patients with antibody deficiency states.
J.Immunol. 120, 1169-1175
- PERRYMAN, L.E. and TORBECK, R.L. (1980)
Combined immunodeficiency of Arabian horses: Confirmation of an autosomal recessive mode of inheritance.
J.Am.Vet.Med.Assoc. 176, 1250-1251
- PETERS, G.J. and VEERKAMP, J.H. (1983)
Purine and pyrimidine metabolism in peripheral blood lymphocytes.
Int.J.Biochem. 15, 115-123
- PETERSON, R.D.A., BURMESTER, B.R. and FREDRICKSON, T.N. (1964)
Effect of bursectomy and thymectomy on the development of visceral lymphomatosis in the chicken.
J.nat.Cancer.Inst. 32, 1343-1354

- PETERSON, R.D.A., COOPER, M.D. and GOOD, R.A. (1965)
The pathogenesis of the immunologic deficiency diseases.
Am.J.Med. 38, 579-604
- PFLEGER, R.C., PIANTADOSI, C. and SNYDER, F. (1967)
The biocleavage of some glyceryl ethers by soluble liver enzymes in a variety of species.
Biochim.Biophys.Acta 144, 633-648
- PINK, J.R.L., BRUDER, A. and MIGGIANO, V.C. (1977)
Genetic control of the response of chicken leucocytes to a T cell mitogen.
Fol.biol.(Praha) 23, 417-418
- PINK, J.R. and VAINIO, O. (1983)
Genetic control of the response of chicken T lymphocytes to concanavalin A: cellular localisation of the low responder defect.
Eur.J.Immunol. 13, 571-575
- PLANET, G. and FOX, I.H. (1976)
Inhibition of phosphoribosylpyrophosphate synthesis by purine nucleosides in human erythrocytes.
J.biol.Chem. 251, 5839-5844
- PRAJDA, N., MORRIS, H.P. and WEBER, G. (1976)
Imbalance of purine metabolism in hepatomas of different growth rates as expressed in behaviour of xanthine oxidase (EC. 1.2.3.2.).
Canc.Res. 36, 4639-4646
- PRINCZ, W. (1984)
Versuche zur Rekonstitution immundefizienter UM-B19 Hühner durch Zelltransfer.
Dissertation, Universität München
- REICHARD, P. (1972)
Control of deoxyribonucleotide synthesis in vitro and in vivo.
Adv.Enzyme Regul. 10, 3-16
- REINHERZ, E.L., COOPER, M.D. and SCHLOSSMAN, S.F. (1981)
Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency disorders.
J.Clin.Invest. 68, 699-705

- REMBOLD, H. and GUTENSOHN, W. (1968)
6-Hydroxylation of the pteridine ring by xanthine oxidase.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 31, 837-841
- REMBOLD, H., METZGER, H., SUDERSHAN, P. and GUTENSOHN, W. (1969)
Catabolism of pteridine cofactors. I. Properties and metabolism in rat liver homogenates of tetrahydrobiopterin and tetrahydro-neopterin.
Biochim.Biophys.Acta 184, 386-396
- REMBOLD, H., METZGER, H. and GUTENSOHN, W. (1971a)
Catabolism of pteridine cofactors. III. On the introduction of an oxygen function into position 6 of the pteridine ring.
Biochim.Biophys.Acta 230, 117-126
- REMBOLD, H., CHANDRASHEKAR, V. and SUDERSHAN, P. (1971b)
Catabolism of pteridine cofactors. IV. In vivo catabolism of reduced pterins in rats.
Biochim.Biophys.Acta 237, 365-368
- REMBOLD, H. und GYURE, W.L. (1972)
Biochemie der Pteridine.
Angew.Chem. 22, 1088-1099
- REMY, Ch.R., RICHERT, D.A., DOISY, R.J., WELLS, I.C. and WESTERFELD, W.W. (1955)
Purification and characterisation of chicken liver xanthine dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 217, 293-305
- RICH, K.C., MEJIAS, E. and FOX, I.H. (1980)
Purine nucleoside phosphorylase deficiency: Improved metabolic and immunologic function with erythrocyte transfusions.
N.Eng.J.Med. 303, 973-977
- ROCKLIN, R.E., WINSTON, C.T. and DAVID, J.R. (1973)
Activation of human blood monocytes by products of sensitized lymphocytes.
J.clin.Invest. 53, 559-564
- ROSE, N.R., BACON, L.D., SUNDICK, R.S., KONG, Y.M., ESQUIVEL, P. and BIGAZZI, P.E. (1977)
Genetic regulation in autoimmune thyroiditis.
In: *Autoimmunity*. ed. Talal, N., pp.63-87, Academic Press, New York

ROWE, P.B. and WYNGAARDEN, J.B. (1966)
The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels.
J.biol.Chem. 241, 5571-5576

ROWE, P.B., TRIPP, E. and CRAIG, G.C. (1979)
Folate metabolism in lectin activated human peripheral blood lymphocytes.
Inn: Biochemistry and Biology of Pteridines. ed. Kisliuk, R.L., Brown, G.M. Elsevier/North Holland, New York-Amsterdam-Oxford pp.587-592

SCHAUENSTEIN, K. and WICK, G. (1974)
Local production of immunoglobulin in the thyroid gland of Obese strain (OS) chickens.
Clin.exp.Immunol. 17, 637-646

SCHAUENSTEIN, K., GLOBERSON, A. and WICK, G. (1982)
Avian lymphokines: 1. Thymic cell growth factor in supernatants of mitogen stimulated chicken spleen cells.
Dev.Comp.Immunol. 6, 533-540

SCHEU, M. (1978)
Zur weiteren Charakterisierung einer Dysgammaglobulinämie beim Huhn und einer möglichen T-Zellregulation durch B-Zellen am Vorgang der Allergie vom verzögerten Typ.
Dissertation, Universität München

SCHMALSTIEG, F.C., NELSON, J.A., MILLS, G.C., MONAHAN, T.M., GOLDMAN, A.S. and GOLDBLUM, R.M. (1977)
Increased purine nucleotides in adenosine deaminase-deficient lymphocytes.
J.Pediat. 91, 48-51

SCHNETZLER, M., OOMMEN, A., NOWAK, J.S. and FRANKLIN, R.M. (1983)
Characterisation of chicken T cell growth factor.
Eur.J.Immunol. 13, 560-566

SCHOLAR, E.M. and CALABRESI, P. (1973)

Identification of the enzymatic pathways of nucleotide metabolism in human lymphocytes and leukemia cells.
Canc.Res. 33, 94-103

SCHRANNER, I., LÖSCH, U. und MERKENSCHLAGER, M. (1982)

Das Serumproteinmuster des Haushuhns. Vergleichende Darstellung der Serumproteine normaler und defekter Hühner.
Zbl.Vet.Med.A. 29, 327-336

SCHRANNER, I., and LÖSCH, U. (1986)

Immunological identification of avian monomeric and polymeric immunoglobulin M and immunoglobulin A after fractionation on sodium dodecylsulfat pore gradient polyacrylamide gels.
Poult.Sci. 65, 360-368

SCHRÖCK, H.D. (1978)

Studien zum genetischen Hintergrund der erblich dysgammaglobulinämischen B12B12-Hühnerlinie.
Dissertation, Universität München

SCHULZ, I. (1985)

Endokrinologische und immunologische Untersuchung der reduzierten Fertilität.
Dissertation, Universität München

SCHWARTZ, S.A., CHOI, Y.S., SHOU, L. and GOOD, R.A. (1977)

Modulatory effects on immunoglobulin synthesis and secretion by lymphocytes from immunodeficient patients.
J.Clin.Invest. 59, 1176-1187

SEEGMILLER, J.E., WATANABE, T. and SCHREIER, M.H. (1977)

The effect of adenosine on lymphoid cell proliferation and antibody formation.
In: Purine and Pyrimidine Metabolism. ed. Elliott, K. and Fitzimons, D.W., Ciba Foundation Symposium 48, pp. 249-267
Elsevier, Amsterdam

SELIGMANN, M., FUDENBERG, H.H. and GOOD, R.A. (1968)

A proposed classification of primary immunologic deficiencies.
Amer.J.Med. 45, 817-825

SHIOTA, T. (1971)

In:Comprehensive Biochemistry ed.Florkin, M. and Stotz, E.M., Elsevier, Amsterdam 21, 111-119

- SIEGAL, F.P. SIEGAL, M. and GOOD, R.A. (1976)
Suppression of B-cell differentiation by leukocytes from hypogammaglobulinemic patients.
J.Clin.Invest. 58, 109-112
- SIEGAL, F.P., SIEGAL, M. and GOOD, R.A. (1978)
Role of helper, suppressor and B-cell defects in the pathogenesis of the hypogammaglobulinemias.
New.Engl.J.Med. 299, 172-178
- SIEGENBEEK van HEUKELOM, L.H., STAAL, G.E.J., STOOP, J.W. and ZEGERS, B.J.M. (1976)
An abnormal form of purine nucleoside phosphorylase in a family with a child with severe defective T-cell and normal B-cell immunity.
Clin.Chim.Acta. 72, 117-124
- SILVERSTEIN, A.M. (1964)
Ontogeny of the immune response.
Science 114, 1423-1425
- SMITH, J.W., STEINER, A.L. and PARKER, C.W. (1971a)
Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation by phytohaemagglutinin.
J.clin.Invest. 50, 442-448
- SMITH, J.W., STEINER, A.L., NEWBERRY, W.M. and PARKER, C.W. (1971b)
Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation.
J.clin.Invest. 50, 432-441
- SNYDER, F.F. and HENDERSON, J.F. (1973)
Alternative pathways of deoxyadenosine and adenosine metabolism.
J.Biol.Chem. 248, 5899-5904
- SNYDER, F.F., MENDELSON, J. and SEEGLER, J.E. (1976)
Adenosine metabolism in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes.
J.clin.Invest. 58, 654-666
- SOLOMON, J.B. (1958)
Lactic and malic dehydrogenases in the developing chick embryo.
Biochem.J. 70, 529-535

STEA, B., BACKLUND, P.S., BERKEY, P.B., CHO, A.K., HALPERN, B.C., HALPERN, R.M. and SMITH, R.A. (1978)

Folate and pterin metabolism by cancer cells in culture.

Cancer Res. 38, 2378-2384

STEA, B., HALPERN, R.M., HALPERN, B.C. and SMITH, R.A. (1980)

Quantitative determination of pterins in biological fluids by high-performance liquid chromatography.

J.Chromatog. 188, 363-375

STEWART, C.C. and HAMILL, B. (1977)

Factors affecting the measurement and interpretation of in vitro lymphocyte reactivity.

In: Regulatory mechanisms on lymphocyte activation. Ed.Lucas, D.O. pp. 461-463 Academic Press, New-York

STEWART, C.C. and HAMILL, B. (1981)

Effect of cell concentration in lymphocyte response to phytohemagglutinin.

J.Reticuloendothel.Soc. 29, 79-88

STIRPE, F. and DELLA Corte, E. (1965)

Regulation of xanthine dehydrogenase in chick liver. Effect of starvation and of administration of purines and purine nucleosides.

Biochem.J. 94, 309-313

STIRPE, F. and DELLA CORTE, E. (1969)

The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O).

J.Biol.Chem. 244, 3855-3863

SUBBA RAO, D.S.V., McDUFFIE, F.C. and GLICK, B. (1978)

The regulation of IgM production in the chick: roles of the Bursa of fabricius, environmental antigens and plasma IgG.

J.Immunol. 120, 783-787

SUGIMOTO, M. and BOLLUM, F.J. (1979)

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in chick embryo lymphoid tissues.

J.Immunol. 122, 392-397

SULLIVAN, D.A. and WIRA, C.R. (1979)

Sex hormone and glucocorticoid receptors in the bursa of Fabricius of immature chicks.

J.Immunol. 122, 2617-2623

- TAUBE, R.A. and BERLIN, R.D. (1970)
Development of xanthine transport in intestine of the chick embryo.
Am.J.Physiol. 219, 666-671
- TAZAWA, H., VISSCHEDIJK, A.H.J., WITTMANN, J. and PIIPER, J. (1983)
Gas exchange, blood gases and acid-base status in the chick before, during and after hatching.
Respiration Physiol. 53, 173-185
- TIETZ, A., LINDBERG, M. and KENNEDY, E.P. (1964)
A new pteridine requiring enzyme system for the oxidation of glyceryl-ethers.
J.Biol.Chem. 239, 4081-4090
- TOIVANEN, P., TOIVANEN, A. and GOOD, R.A. (1972)
Ontogeny of bursal function in chicken. II. Immunocompetent cell for humoral immunity.
J.Exp.Med. 136, 816-831
- TOIVANEN, P. and TOIVANEN, A. (1973a)
Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics.
Eur.J.Immunol. 3, 585-595
- TOIVANEN, P. and TOIVANEN, A. (1973b)
Selective activation of chicken T lymphocytes by Concanavalin A.
J.Immunol. 111, 1602-1603
- TOIVANEN, P., TOIVANEN, A. and TAMMINEN, P. (1974)
Bursal and postbursal cells in chicken. Occurrence of postbursal cells in bone marrow, thymus and spleen.
Eur.J.Immunol. 4, 405-410
- TOIVANEN, P., JALKANEN, S., EEROLA, E., JALKANEN, M. and GRANFORS, K. (1984)
Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 h of incubation.
In: XXII nd International Symposium on biological models p.96
- TRAILL, K.N., BÖCK, G., BOYD, R.L., RATHEISER, K. and WICK, G. (1984)
Ontogeny of surface markers on functionally distinct T cell subsets in the chicken.
Eur.J.Immunol. 14, 61-67

TUBARO, E., LOTTI, B., CAVALLO, G., CROCE, C. and BORELLI, G. (1980)

Liver xanthine oxidase increase in mice in three pathological models. A possible defence mechanism.

Biochem.Pharmacology 29, 1939-1943

UEBEL, I. (1984)

Untersuchungen zur Veränderung von Struktur und Aktivität der Immunglobuline des Huhnes nach Inkubation des Serums mit 2-Mercaptoäthanol.

Dissertation, Universität München

UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H., and STAUFER, J.F. (1972)

Manometric and biochemical techniques.

5th Edition, Minneapolis, Burgess Publishing Company p.146

VAINIO, O. and RATCLIFFE, M.J.H. (1984)

Proliferation of chicken peripheral blood leukocytes in response to pokeweed mitogen is makrophage dependent.

Cell.Immunol. 85, 235-243

VAN LOGHEM, E. (1980)

Genetically determined deficiencies in IgA and IgG.

Haematologia 13, 185-189

WALDMANN, T.A., DURM, M., BRODER, S., BLACKMAN, H., BLAESE, R.M., and STROBER, W. (1974)

The role of suppressor T cells in the pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia.

Lancet II, 609-613

WALDMANN, T.A., BRODER, S., KRAKAUER, R., DURM, M.,

MEADE, B. and GOLDMAN, C. (1976)

Defect in IgA secretion and in IgA specific suppressor cells in patients with selective IgA deficiency.

Trans.Assoc.Am.Physicians 89, 215-244

WALKER, S. and LUCAS, Z.J. (1971)

Mitogen-serum relationship in transformation of lymphocytes in vitro.

Proceedings of the Fourth Leucocyte Culture Conference. ed. O.R. McIntyre) p.49 Appleton-Century-Crafts, New York

WARNER, N.L. and BURNET, F.M. (1961)

The influence of testosterone treatment on the development of the bursa of Fabricius in the chick embryo.

Aust.J.Biol.Sci. 14, 580-587

WARNER, N.L., SZENBERG, A. and BURNET, F.M. (1962)

The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness.

Austr.J.exp.Biol. 40, 373-388

WARNER, N.L. (1967)

The immunological role of the avian thymus and Bursa of Fabricius.

Fol.biol.Praha 13 1-15

WATTS, R.W.E., WATTS, J.E.M. and SEEGMILLER, J.E. (1965)

Xanthine oxidase activity in human tissues and its inhibition by allopurinol (4-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine).

J.Lab.Clin.Med. 66, 688-697

WAUD, W.R. and RAJAGOPALAN, K.V. (1976)

Purification and properties of the NAD^+ -dependent (Type D) and O_2 -dependent (TYP O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase.

Arch.Biochem.Biophys. 172, 354-364

WEBER, W.T. (1970)

Mixed lymphocyte interaction and PHA response of chicken spleen cells in a chemically defined medium.

Res.J.Reticuloendothel.Soc. 8, 37-54

WEBER, W.T. (1973a)

Direct evidence for the response of B and T cells to Pokeweed mitogen.

Cell.Immunol. 9, 482-487

WEBER, W.T. (1973b)

The in vitro response of chicken B cell populations to lipopolysaccharide.

J.Immunol. 111, 1277-1280

WEBER, W.T. (1975)

Avian B lymphocyte subpopulations: Origins and functional capacities.

Transplant.Rev. 24, 113-158

WEBSTER, A.D.B. and ASHERON, G.L. (1974)

Identification and function of T-cells in the peripheral blood of patients with hypogammaglobulinemia.

Clin.exp.Immunol. 18, 499-504

WEBSTER, A.D.B., NORTH, M., ALLSOP, J., ASHERSON, G.L. and WATTS, R.W.E. (1978)

Purine metabolism in lymphocytes from patients with primary hypogammaglobulinemia.

Clin.exp.Immunol. 31, 456-463

WEIDANZ, W.P., WEBER, W.T. and MAQUIRE, H.C. (1976)

Allergic contact dermatitis in the B-cell deficient chicken.

Int.Arch.Allergy 50, 755-758

WEINBAUM, F.I., GILMOUR, D.G. and THORBECKE, G.J. (1973)
Immunocompetent cells of the chicken. III Cooperation of carrier sensitized T cells from agammaglobulinemic donors with hapten immune B cell.

J.Immunol. 110, 1434-1436

WHO REPORT (1979)

Immunodeficiency, Report of a WHO Scientific Group

Clin.Immunol.Immunopathol. 13, 296-359

WICK, G., KITE, J.H., COLE, R.K. and WITEBSKY, E. (1970)

Spontaneous thyroiditis in the Obese strain of chickens. IV. The effect of thymectomy and thymobursectomy on the development of the disease.

J.Immunol. 104, 45-53

WICK, G., BOYD, R., HALA, K., THUNOLD, S. and KOFLER, H. (1982)

Pathogenesis of spontaneous autoimmune thyroiditis in Obese strain (OS) chickens.

Clin.exp.Immunol. 47, 1-18

WIELAND, H. and LIEBIG, R. (1944)

Ergänzende Beiträge zur Kenntnis der Pteridine.

Justus.Liebig's Ann.Chem. 555, 146-156

WOODWARD, N.D., LEE, P.C., DELAPP, N.W. and FISHER, J.R. (1972)

Induction of chicken liver xanthine dehydrogenase by purines.

Arch.Biochem.Biophys. 153, 537-542

YACHNIN, S. and RAYMOND, J. (1975)

An absolute requirement for serum macromolecules in phytohaem-agglutinin-induced human lymphocyte DNA synthesis.

Clin.exp.Immunol. 22, 153-166

YOUNT, W., HONG, R., SELIGMANN, M., GOOD, R.A. and KUNKEL, H.G. (1970)

Imbalances of gamma globulin subgroups and gene defects in patients with primary hypogammaglobulinemia.

J.clin.Invest. 49, 1957-1966

ZIEGLER, I. (1960)

Tetrahydrobiopterin-Derivat als lichtempfindliche Verbindung bei Amphibien und Insekten.

Z.Naturf. 15b. 460-465

ZIEGLER, I. (1965)

Pterine als Wirkstoffe und Pigmente.

In: Ergeb.Physiol.Biol.Chem.exp.Pharmakol. 56, 1-66

ZIEGLER, I. and KOKOLIS, N. (1979)

In vivo metabolism of deuterio-L-phenylalanine and deuterio-L-tyrosine and levels of tetrahydrobiopterin in the blood of tumor bearing organisms.

In: Chemistry and biology of pteridines. ed. Kisliuk, R.L. and Brown, G.M. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press pp.165-170

ZIEGLER, I., KOLB, H.J., BODENBERGER, U. and WILMANN, W. (1982a)

Biopterin level in peripheral blood cells as a marker for hemopoietic cell proliferation during autologous bone marrow transplantation in beagle dogs.

Blut 44, 261-270

ZIEGLER, I., FINK, M. and WILMANN, W. (1982b)

Biopterin level in peripheral blood cells as a marker for hemopoietic cell proliferation during leukemia and polycythemia vera.

Blut 44, 231-240

ZIEGLER, I., HAMM, U. and BERNDT, J. (1983)

Participation of pterins in the control of lymphocyte stimulation and lymphoblast proliferation.

Canc.Res. 43, 5356-5359

ZIEGLER, I. (1984)

Pteridine formation during lectin induced activation of mouse spleen lymphocytes.

In: Biochemical and clinical aspects of pteridines Vol.3 ed, Pfeleiderer, W., Wachter, H. and Curtius, H., Ch. Walter de Gruyter and Co, Berlin, New York pp.265-274

ZIEGLER, I., SCHWULERA, U., MÜLLER-HERMES, W.J.P., SONNEBORN, H.H. (1984)

Modulation of interleukine-activity by pteridines.

Lymphokine Research 3, 284-290

ZIEGLER, I. (1986)

Pteridine formation during lectin-induced lymphocyte activation. J.Cell.Biochem. in press

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

BÖHRINGER, D. and LÖSCH, U. (1982)

Agammaseum (AChS): An optimal medium additive for PWM stimulation of avian lymphocytes.

Immunobiol. 160, 330

BÖHRINGER, D. (1983)

Influence of various sera or other additive applications in PWM stimulated chicken lymphocytes.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, 475

BÖHRINGER, D. (1983)

Effect of supernatants from cultivated lymphocytes of control and immune deficient chickens on the ³H-Tdr incorporation under PWM stimulation.

In: Abstracts of the 15th FEBS-Meeting p.219 Brüssel

BÖHRINGER, D. and LÖSCH, U. (1983)

PWM and ConA induced stimulation of blood lymphocytes from immune deficient chickens.

Immunobiol. 165, 243

BÖHRINGER, D., TIEMEYER, W. and LÖSCH, U. (1984)

Lymphocytes and supernatants from control and immune deficient UM-B19 chickens.

In: Abstracts der 14. Leukozytenkulturen Konferenz, Hamburg

BÖHRINGER, D., TIEMEYER, W. and LÖSCH, U. (1985)

Lymphocyte xanthine dehydrogenase in avian dysgammaglobulinemia.

In: Abstracts of 7th European Immunology Meeting, Jerusalem, Israel, p.185

BÖHRINGER, D., ZIEGLER, I., TIEMEYER, W., LÖSCH, U. and MERKENSCHLAGER, M. (1985)

Purines and Pteridines in lymphocytes from control and immune deficient UM-B19 chickens.

Israel J.Clin.Biochem.Lab.Science 4, 81

LEBENS LAUF

geboren	am 23. Mai 1952 in Rosenheim am Inn
Eltern	Heribert Henrich und Maria Henrich, geb. Edinger
1958 - 1963	Grund und Hauptschule in Wasserburg/Inn
1963 - 1972	Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium in Wasserburg/Inn
Juni 1972	Abitur
November 1972	Beginn des Studiums Biologie/Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Ludwig-Maximilian- Universität in München
Juli 1974	Diplom-Vorprüfung in Biologie an der Universi- tät München
November 1974	Beginn des Biologie Hauptstudiums mit Hauptfach Zoologie an der Universität München
Februar 1977	Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik und Biochemie an der Universität München
April 1977 - Juni 1978	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München Thema: Einfluß von Gram-positiven Bakterienzell- wandsubstanzen auf die cytotoxischen Eigenschaf- ten und die Stimulierbarkeit von Lymphozyten
1.8.78-1.9.79	Befristete Stelle als wissenschaftlicher Mitarbei- ter an der Universität Ulm, Abt. Hämatologie
31.7.79-4.1.84	verheiratet mit Herrn Stefan Böhringer, Rechts- anwalt
1.9.80-31.8.84	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Universi- tät München
1981	Beginn der vorliegenden Dissertation
5.3.1985	Geburt des Sohnes Constantin
12.5.1986	Heirat mit Herrn Dr. Winfried Tiemeyer, Chemiker

